

Т.Е. Никифорова

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ
ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**
Лабораторный практикум



Иваново, 2016

Министерство образования и науки Российской Федерации
Ивановский государственный химико-технологический университет

Т.Е. Никифорова

Биологическая безопасность пищевых продуктов

Лабораторный практикум

Иваново 2016

УДК 664.001.25(07)

Никифорова, Т.Е.

Биологическая безопасность пищевых продуктов: лаб. практикум / Т.Е. Никифорова; ФГБОУ ВО Иван. гос. хим.-технол. ун-т. – Иваново, 2016. – 96 с.

Лабораторный практикум включает лабораторные работы, позволяющие определять в пищевых продуктах содержание чужеродных веществ, относящихся к различным классам, в том числе, вредных природных компонентов пищи, биологических контаминантов, антиалиментарных факторов питания, потенциально опасных химических веществ (разделы 1–3), а также выявлять фальсификацию продукции (раздел 4), овладеть методами детоксикации (раздел 5) и проводить биотестирование для оценки безопасности пищевых продуктов (раздел 6).

Предназначен для студентов вузов, изучающих дисциплины «Биологическая безопасность пищевых продуктов» и «Системы менеджмента безопасности пищевой продукции», обучающихся по направлениям подготовки «Биотехнология» (профиль подготовки «Пищевая биотехнология») и «Продукты питания из растительного сырья» (профили подготовки «Технология жиров, эфирных масел и парфюмерно-косметических продуктов» и «Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий»).

Табл. 22. Ил. 12. Библиогр.: 27 назв.

Печатается по решению редакционно-издательского совета ФГБОУ ВО «Ивановского государственного химико-технологического университета»

Рецензенты:

Орган по сертификации «Регион Тест»; кандидат технических наук, Е.В. Захарова (ФГБОУ ВО «Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина»).

© Никифорова Т.Е., 2016

© ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет», 2016

Введение

Проблема обеспечения безопасности пищевых продуктов в современных условиях становится весьма актуальной, поскольку качество продуктов питания является одним из основных факторов, определяющих здоровье нации.

Под безопасностью продуктов питания следует понимать отсутствие опасности для здоровья человека при употреблении продуктов питания как с точки зрения острого негативного воздействия (пищевые отравления и пищевые инфекции), так и с точки зрения опасности отдаленных последствий (канцерогенное, мутагенное и тератогенное действие).

С точки зрения безопасности продуктов питания особое внимание следует уделять загрязнению сельскохозяйственного сырья отходами промышленных производств, пестицидами, удобрениями, токсичными веществами, мигрирующими в пищевое сырье при контакте с оборудованием и из упаковочных материалов, при несоблюдении технологии производства, нарушении правил транспортировки и хранения продовольственного сырья и пищевых продуктов. Особого внимания требуют возможности загрязнения сырья и продуктов питания бактериальными токсинами, а также микотоксинами при нарушении режимов и сроков хранения сырья и готовых продуктов.

Продукты питания служат для человека источником энергии, материалом для построения клеток организма, целого ряда биологически активных веществ, и все они содержат миллионы различных химических соединений.

Требования, предъявляемые к пищевым продуктам, сводятся к их способности удовлетворять физиологические потребности человека в пищевой ценности (основных питательных веществах – белках, жирах, углеводах, витаминах, минеральных элементах, а также энергии), биологической ценности (незаменимых аминокислотах и минорных компонентах пищи) и быть безопасными для здоровья человека по содержанию различных химических, радиоактивных, биологических веществ и их соединений, микроорганизмов и других биологических организмов.

В то же время пища может быть источником потенциально опасных веществ, которые подразделяются на природные и антропогенные.

Пищевые продукты могут неблагоприятно воздействовать на здоровье человека в результате нутриентного несоответствия потребностям организма (количественного и качественного) и содержащихся в них ксенобиотиков.

Все пищевые вещества полезны здоровому организму в оптимальных количествах и соотношениях. Микрокомпоненты в количествах, превышающих некоторое значение, могут быть опасны для здоровья.

Ксенобиотики могут попадать в пищу случайно в виде примесей (контаминантов) из окружающей среды или в процессе технологической обработки при контакте с оборудованием, или их вводят специально в виде пищевых или технологических добавок. К ним относятся: природные компоненты пищи, оказывающие пагубное действие; вещества из окружающей

среды, вызывающие вредное воздействие (контаминаты); вещества, специально вносимые по технологическим соображениям.

Наибольшую опасность для здоровья человека представляют пищевые продукты, загрязненные патогенными, условно-патогенными микроорганизмами, яйцами гельминтов (биологическими ксенобиотиками) и вредными химическими веществами антропогенного происхождения (химическими ксенобиотиками).

Обеспечение безопасности продуктов питания представляет собой сложную комплексную проблему, требующую многочисленных усилий для ее решения как со стороны ученых различных специальностей – химиков, биохимиков, микробиологов, токсикологов, нутрициологов и т.д., так и со стороны производителей продуктов питания, санитарно-эпидемиологических служб, государственных органов, а также рационального, бдительного подхода со стороны потребителей.

Раздел 1. Природные токсиканты

Бактериальные токсины. Бактериальные токсины загрязняют пищевые продукты и являются причиной острых пищевых интоксикаций. Наиболее часто регистрируемые интоксикации, связанные с поражением пищевых продуктов некоторыми бактериальными токсинами, рассмотрены ниже.

Стафилококковое отравление. *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк) – грамположительные бактерии являются причиной стафилококкового пищевого отравления. Продуцируют семь энтеротоксинов: А, В, С₁, С₂, D, Е, которые представляют собой полипептиды с молекулярной массой 26360-28500 дальтон.

Данные о механизме токсичного действия стафилококковых энтеротоксинов весьма ограничены. Показано, что они способны нарушать обмен аденозинтрифосфата и ионов магния, а также вызывают поражение слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, разрушение ворсинок, расширение лимфатических сосудов. Наиболее благоприятной средой для роста и развития стафилококков является молоко, мясо и продукты их переработки, а также кондитерские кремовые изделия, в которых концентрация сахара составляет менее 50 %.

Энтеротоксины *S. aureus* термостабильны, устойчивы к действию протеолитических ферментов, инактивируются лишь после 2-3-х часового кипячения. Бактерицидным действием по отношению к стафилококкам обладают уксусная, лимонная, фосфорная, молочная кислоты при рН ниже 4,5. Кроме того, жизнедеятельность бактерий прекращается при концентрации NaCl 12 %, сахара 60-70%; вакуумная упаковка также ингибирует рост бактерий. Стафилококковые энтеротоксины являются причиной 27-45 % всех пищевых токсикоинфекций.

Ботулизм. *Clostridium botulinum* продуцируют токсины, представляющие особую опасность для человека. Эти микроорганизмы являются облигатными анаэробами с термостабильными спорами. Различают А, В, С, D, Е, F и G виды ботулотоксинов, причем наибольшей токсичностью обладают токсины А и Е. В нативном состоянии каждый из токсинов ассоциирован с определенным нетоксичным компонентом, величина которого и определяет размер токсичного комплекса. Синтезируется ботулинический токсин микробной клеткой, вероятно, в форме протоксина, который вступает в ассоциацию с определенными нетоксичными компонентами. Активация протоксинов осуществляется протеолитическими ферментами.

Все ботулинические токсины относятся к группе нейротоксинов, которые поражают в основном периферическую нервную систему. Они загрязняют рыбные, мясные продукты, фруктовые, овощные и грибные консервы при недостаточной тепловой обработке и в условиях резкого снижения содержания кислорода (герметично закупоренные консервы). Кроме того, ботулотоксины характеризуются высокой устойчивостью к действию протеолитических

ферментов, кислот, низких температур, но инактивируются под влиянием щелочей и высоких температур (80°C – 30 мин; 100°C – 15 мин).

Ботулизм встречается довольно часто (500600 случаев в год), летальность достигает порядка 7–9%.

Сальмонеллез. *Salmonella Enterobacteriaceae* – патогенная кишечная бактерия вырабатывает эндотоксин, энтеротоксин и цитотоксин, которые оказывают прямое повреждающее действие на клетки слизистой оболочки кишечника, что приводит к диарее, нарушает проницаемость клеточных мембран, в результате чего развивается интоксикация, усиливается диарея, наступает обезвоживание организма.

Сальмонеллез занимает одно из ведущих мест среди пищевых токсикоинфекций, большая часть заболеваний человека сальмонеллезом связана с употреблением в пищу мяса крупного рогатого скота, птицы и яиц.

Возбудители сальмонеллеза при низких температурах длительно остаются жизнеспособными, а при температуре 4-6°C (температура в холодильнике) могут размножаться. Сохраняются при температуре 10-20°C в течение нескольких месяцев, в колбасных изделиях от 6 до 13 дней, в замороженном мясе до 13 месяцев, в яйцах до 1 года. При температуре 50-60°C погибают через 1-3 минуты, кипячение убивает их мгновенно, однако в толще пищевых продуктов, особенно мясных, они могут сохраняться даже при длительном (до 3 часов) проваривании. Губительна для сальмонелл кислая среда (рН ниже 5,0) и ультрафиолетовое излучение.

Патогенные штаммы *Esherichia coli* являются продуцентами термолабильного и термостабильного энтеротоксинов. Энтеропатогенные штаммы *E. coli* синтезируют белок с молекулярной массой около 100 тыс. Да и изоэлектрической точкой 6,9. В бактерии он ассоциирован с эндотоксином или капсульным веществом. При определенных условиях этот комплекс распадается с образованием термостабильного и термолабильного компонентов.

Термолабильный – представляет собой белок с молекулярной массой от 2000 до $5 \cdot 10^5$ Да. Разрушается под действием проназы, но устойчив к обработке трипсином. Кислотный гидролиз при 65°C в течение 30 мин полностью инактивирует токсин.

Термостабильный белок имеет в своем составе эндотоксин, чем объясняется его устойчивость к нагреванию (сохраняет свое токсическое действие при температуре 120°C). Он также характеризуется высокой устойчивостью к кислотам и протеолитическим ферментам. Молекулярная масса невелика – от 1000 до 10000 Да.

Антигенными свойствами обладает термолабильный энтеротоксин *E. coli*. По характеру биологического действия он похож на холерный токсин (энтеротоксин *V. cholerae*); помимо диареогенной активности, обладает способностью повышать проницаемость капилляров. Действие термостабильного энтеротоксина отличается скоротечностью.

Лабораторная работа №1

Бактериологическое исследование молока и рыбы

Период, в течение которого бактерии не развиваются в молоке и даже частично отмирают, называют бактерицидной фазой. Бактерицидные свойства молока зависят от присутствия лизоцимов, антител и лейкоцитов. Бактерицидная фаза имеет большое значение, поскольку молоко можно считать свежим и полноценным только в течение этой фазы, а по окончании ее происходит развитие микроорганизмов и порча молока.

Продолжительность бактерицидной фазы зависит от количественного и качественного состава первичной микрофлоры молока, температуры хранения молока и от индивидуальных особенностей животного. Особенно большое влияние на продолжительность фазы оказывает температура хранения молока (табл. 1).

Таблица 1. Влияние температуры хранения молока на продолжительность бактерицидной фазы

Температура хранения, °С	27	30	25	10	5	0
Продолжительность бактерицидной фазы, ч	2	3	6	26	36	48

С увеличением количества микробов в молоке на несколько тысяч в 1 см³ при одной и той же температуре хранения продолжительность бактерицидной фазы сокращается примерно в 2 раза. Следовательно, существуют два пути увеличения продолжительности бактерицидной фазы – получение бактериально чистого молока и его немедленное охлаждение. Для определения бактериальной чистоты и свежести молока, а также рыбы проводят пробу на редуктазу, основанную на способности бактерий выделять редуктазу, которая восстанавливает красители (метиленовый синий, резазурин). Обесцвечивание метиленового синего и резазурина наступает тем быстрее, чем больше микробов в продукте.

Определение общего количества бактерий в молоке косвенным методом

Проба с метиленовым синим

Реактивы: метиленовый синий, вода дистиллированная, молоко.

Посуда и приборы: пробирки стеклянные стерильные, мерная колба на 200 см³, мерный цилиндр, термостат.

Ход анализа

Методы определения общего количества бактерий в молоке сведены в ГОСТ Р 53430-2009 «Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа».

Приготовление раствора метиленового синего. Раствор метиленового синего готовят следующим образом: 5 см³ насыщенного спиртового раствора метиленового синего помещают в колбу на 200 см³, доводят до метки дистиллированной водой и хорошо перемешивают. Срок хранения полученного раствора не более 7 суток.

Проведение анализа. В пробирки наливают 10 см³ исследуемого молока и 0,5 см³ метиленового синего, закрывают пробками и смешивают путем медленного трехкратного переворачивания пробирок. Пробирки помещают в термостат с температурой воды 38°C. Такую температуру поддерживают в течение всего опыта до полного обесцвечивания молока. Вода в термостате после погружения пробирок с молоком должна доходить до уровня жидкости в пробирке или быть немного выше.

Момент погружения пробирок в термостат при установленной температуре считают началом анализа. Первые 20 мин наблюдение ведут непрерывно, в дальнейшем просмотр пробирок проводят периодически через 2 ч и 5,5 ч после начала анализа.

Оценка результатов. По скорости обесцвечивания метиленового синего в пробирках молоко подразделяют на 4 класса в соответствии с данными табл.2.

Таблица 2. Оценка качества молока в зависимости от результатов пробы на редуктазу

Класс	Продолжительность реакции		Окраска молока		Количество бактерий в 1 см ³ молока	Оценка качества
	с метиленовым синим	с резазурином	с метиленовым синим	с резазурином		
1	Более 5,5 ч	Через 1 ч	Обесцвечивание	Сине-стальная	Менее 500 тыс.	Хорошее
2	От 2 ч до 5,5 ч	Через 1 ч	Обесцвечивание	Сиреневая или сиренево-фиолетовая	От 500 тыс. до 1 млн	Удовлетворительное
3	От 20 мин до 1 ч	Через 1 ч	Обесцвечивание	Розовая или белая	От 4 млн до 20 млн	Плохое
4	20 мин и менее	Через 1 ч	Обесцвечивание	Белая	Более 20 млн	Очень плохое

Проба с резазурином

Реактивы: резазурин, молоко, вода дистиллированная.

Посуда и приборы: пробирки стеклянные стерильные, корковые пробки, термостат, стакан стеклянный, мерный цилиндр, весы лабораторные технические.

Ход анализа

Приготовление растворов резазурина. Основной раствор резазурина готовят следующим образом: 100 г резазурина растворяют в 200 см³ дистиллированной воды; хранят в холодильнике, защищая от света.

Рабочий раствор резазурина готовят, разбавляя основной раствор дистиллированной водой в соотношении 1: 2,5 (например, к 10 см³ основной пробы резазуринового раствора добавляют 25 см³ дистиллированной воды). Срок хранения рабочего раствора при температуре 8-10°С 7 суток.

Проведение анализа. В стерильные пробирки вносят по 1 см³ рабочего раствора резазурина и по 10 см³ исследуемого молока, закрывают корковыми пробками, смешивают путем трехкратного переворачивания пробирок. Пробирки ставят в термостат с температурой воды 38°С и защищают от действия прямых солнечных лучей. Показания снимают через 20 мин и через 1 ч, не встряхивая и не переворачивая пробирки. Через 20 мин пробирки с обесцвеченным молоком удаляют из водяной бани. Появление окрашивания молока в этих пробирках при встряхивании не учитывается. Оставшиеся пробирки однократно переворачивают и оставляют в бане до конца анализа.

Оценка результатов: в зависимости от времени обесцвечивания и изменения окраски содержимого пробирок молоко относят к одному из четырех классов в соответствии с табл. 2.

Лабораторный метод определения свежести рыбы по редуктазной пробе

Реактивы: метиленовый голубой 0,1% водный раствор, вазелиновое масло, свежая рыба, вода дистиллированная.

Посуда и приборы: стеклянные стерильные пробирки, термостат, весы лабораторные технические, мерный цилиндр, мясорубка или нож.

Ход анализа

Лабораторная работа проводится в соответствии с ГОСТ 7636-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа».

Свежую рыбу, освобожденную от костей, пропускают через мясорубку или мелко рубят ножом. Полученный фарш массой 5 г вносят в пробирку, заливают двойным количеством дистиллированной воды, встряхивают и оставляют на 30 мин. Затем приливают 1 мл 0,1 % водного раствора

метиленового голубого, пробирку энергично встряхивают для получения равномерной окраски фарша. После этого заливают слоем вазелинового масла толщиной 0,5-1 см.

Подготовленную таким образом пробу помещают в термостат при температуре 37°C и периодически ведут наблюдение за обесцвечиванием экстракта.

Оценка результатов. Чем быстрее произойдет обесцвечивание вытяжки из рыбы, к которой добавлен раствор метиленового голубого, тем больше содержится в ней фермента редуктазы (дегидразы), следовательно, больше микроорганизмов, его продуцирующих. Оценка результатов определения свежести рыбы производится с помощью табл. 3.

Таблица 3. Оценка результатов определения свежести рыбы

Время обесцвечивания, мин	Количество микроорганизмов в 1 г фарша	Санитарная оценка рыбы
40	10^6 и выше	Недоброкачественная
40-150	10^4 - 10^5	Сомнительной свежести
Больше 150	до 10^3	Свежая

Метод определения пастеризации молока и молочных продуктов

Молоко и продукты, получаемые из него, относятся к категории скоропортящихся. Поэтому перед специалистами молочной отрасли стоит задача обеспечения санитарного качества выпускаемой продукции, исключая передачу и распространение инфекционных заболеваний среди потребителей.

Наиболее известным и широко распространенным методом обеззараживания молока является воздействие на него повышенных температур в течение определенного периода времени. На этом основывается процесс пастеризации, названный в честь своего основателя – французского ученого Луи Пастера. Пастеризация является не только эффективным, но и наиболее простым и дешевым способом обеззараживания молока.

С получением новых знаний о свойствах молока, развитием технологии и техники его промышленной переработки новое развитие получает и технология его тепловой обработки.

В зависимости от параметров теплового воздействия на молоко можно дифференцировать следующие виды пастеризации:

1) длительная пастеризация – обработка при температуре 63–65°C в течение 20-30 мин;

2) кратковременная пастеризация включает несколько режимов – нагрев молока до температуры 74-74°C в течение 15-40 с или же до 85-87°C, либо до 90-95°C без выдержки;

3) высокотемпературная пастеризация – обработка молока при температуре от 105–107°С до 125°С в течение 0,1-1,0 с или без выдержки.

Применением тех или иных режимов пастеризации можно достичь желаемого уровня санитарного качества молока. Выдерживание молока при температуре 63-65°С в течение 30 мин приводит к отмиранию вегетативных форм микроорганизмов, погибает в том числе и неспорообразующая туберкулезная палочка. Именно с учетом тепловой устойчивости последней установлены режимы длительной пастеризации молока.

Чтобы достичь уничтожения спор микроорганизмов, температура обработки молока должна достигать 80°С и более. С этой целью применяют кратковременную или высокотемпературную пастеризации.

Нагревание молочного сырья до температур пастеризации приводит к инактивации ферментов, тепловая устойчивость которых так же индивидуальна, как и температурная устойчивость микроорганизмов. Температурные режимы пастеризации, принятые в молочной промышленности, полностью инактивируют щелочную фосфатазу. Известно, что после нагревания молока до 63-65°С в течение 30 мин фосфатаза в нем не обнаруживается.

Тепловая обработка фосфатазы используется в молочной промышленности для определения эффективности пастеризации молока при производстве питьевого пастеризованного молока. При производстве кисломолочных напитков или масла, а также при режимах пастеризации от 80°С и выше, качество пастеризации определяют пробой на пероксидазу.

Таким образом, в зависимости от режима пастеризации и вида обрабатываемой молочной продукции ставят пробу либо на фосфатазу, либо на пероксидазу. Сущность ферментных проб состоит в том, что патогенные микроорганизмы погибают при тех же параметрах нагрева молока, при которых инактивируются ферменты, естественно присутствующие в молоке.

Пероксидаза определяется по реакции с йодисто–калиевым крахмалом. Метод основан на разложении перекиси водорода ферментом пероксидазой, содержащейся в молоке и молочных продуктах. Освобождающийся при разложении перекиси водорода активный кислород окисляет йодистый калий, освобождая йод, который образует с крахмалом соединения синего цвета.

Определение фосфатазы по реакции с фенолфталеинфосфатом натрия. Метод основан на гидролизе фенолфталеинфосфата натрия ферментом фосфатазой, содержащимся в молоке и молочных продуктах. Освобождающийся при гидролизе фенолфталеин в щелочной среде дает розовое окрашивание.

Химические методы определения наличия в молочных продуктах ферментов сведены в ГОСТ 3623-73 «Молоко и молочные продукты. Методы определения пастеризации».

Определение пероксидазы с йодисто-калиевым крахмалом

Реактивы: перекись водорода 0,5 % раствор, крахмал картофельный, калий йодистый, вода дистиллированная.

Посуда и приборы: пробирки на 10-20 см³, пипетки вместимостью 2,5 и 10 см³ с ценой деления 0,1 см³, капельницы из темного стекла или покрытые черным лаком, колбы мерные вместимостью 250 и 500 см³, колбы конические вместимостью 250 см³, баня водяная с нагревательным прибором, воронки стеклянные, фильтры бумажные диаметром 11 см, весы лабораторные аналитические, весы лабораторные технические.

Ход анализа

Приготовление 0,5 % раствора перекиси водорода. Для приготовления 0,5 % раствора перекиси водорода имеющийся концентрированный раствор, в зависимости от содержания в нем перекиси водорода, разводят дистиллированной водой. Раствор быстро разлагается, поэтому его не следует долго хранить.

Приготовление йодисто-калиевого крахмала. 3 г крахмала взвешивают с погрешностью не более 0,01 г и смешивают с 5-10 см³ дистиллированной воды до получения однородной массы. Отдельно в колбе доводят до кипения 100 см³ дистиллированной воды и при непрерывном перемешивании приливают воду к разведенному крахмалу, не допуская образования комков. Полученный раствор доводят до кипения. После охлаждения к раствору крахмала прибавляют 3 г йодистого калия, перемешивая до растворения кристаллов йодистого калия. Раствор йодисто-калиевого крахмала является нестойким реактивом, поэтому его следует хранить в темном месте не более двух дней.

Допускается вместо йодисто-калиевого крахмала применять отдельно приготовленный 1 % раствор крахмала и 10 % раствор йодистого калия.

Проведение анализа. В пробирку отмеривают или отвешивают анализируемый продукт и дистиллированную воду в количестве, указанном в табл. 4.

Кисло-молочные напитки с плодово-ягодными наполнителями фильтруют через бумажный фильтр.

Для получения 2-3 см³ плазмы масла навеску 50 г сливочного масла расплавляют при температуре не выше 50°C, затем охлаждают и застывший слой жира удаляют. После добавления воды анализируемые продукты тщательно растирают стеклянной палочкой.

Таблица 4. Соотношение исходных реактивов для анализа

Наименование продукта	Количество продукта	Количество дистиллированной воды, см ³
Молоко пастеризованное	5 см ³	-
Сливки	2-3 см ³	2-3
Сметана	2-3 г	2-3
Кисло-молочные напитки (кефир, ацидофильное молоко, ацидофилин, кумыс, йогурт и др.); простокваша, напитки с плодово-ягодными наполнителями (фильтраты)	5 см ³	-
Белковые продукты (творог, творожные изделия и др.)	2-3 г	2-3
Сливочное масло (плазма масла)	2-3 см ³	2-3

В пробирку с указанным количеством продукта и воды добавляют 5 капель раствора йодисто-калиевого крахмала и 5 капель 0,5 % раствора перекиси водорода, вращательными движениями перемешивают содержимое пробирки после добавления каждого реактива. Затем определяют наличие пероксидазы по изменению окраски.

Если применяют отдельно раствор крахмала и йодистого калия, то поступают следующим образом: в каждую пробирку с продуктами, подготовленными, как указано в табл. 4, приливают 0,5 см³ 1 % раствора крахмала, 2 капли 10 % раствора йодистого калия и 5 капель 0,5 % раствора перекиси водорода. Содержимое пробирок перемешивают после добавления каждого реактива, затем определяют наличие пероксидазы по изменению окраски.

Оценка результатов. При отсутствии фермента пероксидазы в молоке и молочных продуктах цвет содержимого пробирок не изменится. Следовательно, молоко и молочные продукты подвергались пастеризации при температуре не ниже 80°C.

При наличии пероксидазы в молоке, сливках, сливочном масле содержимое пробирок приобретает темно-синее окрашивание. При наличии пероксидазы в кисло-молочных продуктах и кисло-сливочном масле содержимое пробирок не более чем через 2 мин приобретает серовато-синюю окраску, постепенно переходящую в темно-синюю. Следовательно, молоко и молочные продукты не подвергались пастеризации или были смешаны с непастеризованными молочными продуктами. Появление окраски в пробирках более чем через 2 мин после добавления йодисто-калиевого крахмала и перекиси водорода не указывает на отсутствие пастеризации, так как может вызываться разложением реактивов.

Чувствительность метода позволяет обнаружить добавление не менее 5 % непастеризованных молочных продуктов к пастеризованным, а для напитков с плодово-ягодными наполнителями – 0,5 %.

Определение фосфатазы по реакции с фенолфталеинфосфатом натрия

Реактивы: аммиак водный, 1 н. раствор, аммоний хлористый, 1 н. раствор, смесь буферная аммиачная, фенолфталеинфосфат натрия порошкообразный, вода дистиллированная.

Посуда и приборы: весы лабораторные аналитические, весы лабораторные технические, пробирки стеклянные вместимостью 10-20 см³, пипетки измерительные вместимостью 1 и 2 см³ с ценой деления 0,1 см³, колбы мерные вместимостью 100 см³, цилиндры мерные вместимостью 100 см³, баня водяная с нагревательным прибором, пробки резиновые.

Ход работы

Приготовление 0,1 % раствора фенолфталеинфосфата натрия. 0,1 г порошкообразного фенолфталеинфосфата натрия, взвешенного с погрешностью не более 0,0002 г, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ с небольшим количеством буферной смеси, затем доливают буферную смесь до метки и перемешивают.

Приготовление аммиачной буферной смеси. 80 см³ 1н. раствора аммиака смешивают с 20 см³ 1 н. раствора хлористого аммония.

Проведение анализа. В пробирку отмеривают анализируемый продукт, дистиллированную воду и реактив в количестве, указанном в табл. 5.

Таблица 5. Соотношение исходных компонентов для анализа

Наименование продукта	Количество продукта, см ³	Количество дистиллированной воды, см ³	Количество раствора фенолфталеинфосфата натрия, см ³
Молоко пастеризованное	2	-	1
Сливки	2	2	1
Кисло-молочные напитки: кефир, ацидофильное молоко, йогурт и др.	2	2	2
Простокваша	2	2	2

После добавления дистиллированной воды и реактива содержимое пробирки закрывают пробкой и взбалтывают. Затем пробирку помещают в водяную баню с температурой воды от 40 до 45°C и определяют окраску содержимого пробирки через 10 мин и через 1 ч.

Оценка результатов. При отсутствии фермента фосфатазы в молоке и молочных продуктах окраска содержимого пробирки не изменяется. Следовательно, молоко и молочные продукты подвергались пастеризации при температуре не ниже 63°C. При наличии фосфатазы в молоке и молочных продуктах содержимое пробирки приобретает окраску от светло-розовой до ярко-розовой. Следовательно, молоко и молочные продукты не подвергались пастеризации или подвергались пастеризации при температуре ниже 63°C, или были смешаны с непастеризованными продуктами.

Контрольные вопросы

1. Перечислите и охарактеризуйте пищевые токсикоинфекции.
2. Что называют бактерицидной фазой? От чего она зависит?
3. Как определить количество бактерий в молоке косвенным методом с помощью пробы с метиленовым синим?
4. Как определить количество бактерий в молоке косвенным методом с помощью пробы с резазурином?
5. Как определить степень свежести рыбы?

Лабораторная работа №2

Определение в муке посторонних примесей и спорыньи

В муку при обмолоте пшеницы или ржи могут попадать зерна ядовитых растений (горчак, вязель, куколь), а также зерна, пораженные грибковыми болезнями такими, как головня и спорынья. Спорынья – болезнь злаков, вызываемая грибом *Claviceps purpurea* и характеризующаяся образованием в колосках вместо зерновок черно-фиолетовых рожков (склероциев), представляющих собой покоящуюся стадию гриба.

В черно-фиолетовых рожках содержатся алкалоиды – эрготамин, а также печально известный наркотик, сильнейший галлюциноген – ЛСД – диэтиламид лизергиновой кислоты.

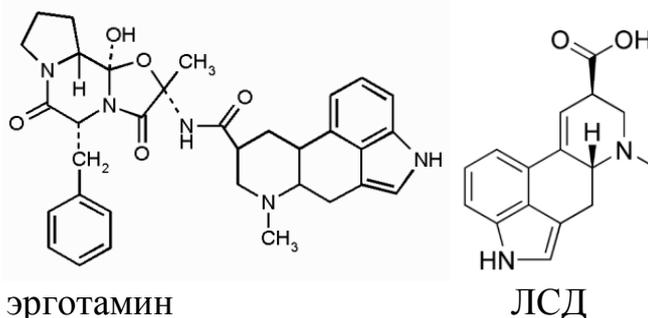


Рис. 1. Структурные формулы эрготамина и ЛСД

Примесь их в муке или корме вызывает тяжелое заболевание – эрготизм. Эрготизм – отравление человека и животных спорыньей или лекарственными препаратами, приготовленными из нее. У человека характеризуется комплексом соматических, неврологических и психических расстройств.

В прошлом во многих странах мира наблюдались эпидемии и эпизоотии от спорыньи. С повышением культуры земледелия распространенность болезни

на хлебных злаках уменьшилась. Возбудитель спорыньи поражает более 170 культурных и дикорастущих злаков, но чаще всего рожь; образует склероции, как правило, в женских половых органах злаков – завязях; размножается спорами, разносимыми в период цветения злаков дождем, ветром, животными, человеком. Болезнь распространена в районах умеренного и влажного климата. Вредоносность может быть очень высокой. При наличии в колосе более 20 склероциев на образование зерна используется лишь около 20 % всего количества питательных веществ, поступающих в колос. Меры борьбы: очистка зерна ржи и других злаков от рожков; посев озимых и яровых хлебов в сжатые сроки, чтобы избежать одновременного развития, цветения и созревания растений; апробация посевов с целью выделения здоровых семенных участков; лущение стерни; глубокая зяблевая вспашка; подбор сортов с коротким и дружным периодом цветения. Так как спорынья сохраняет свои ядовитые свойства при высокой температуре, то даже в процессе выпечки хлеба они не уничтожаются.

Поэтому содержание таких ядовитых примесей строго ограничивается. В муке допускается не более 0,05 % спорыньи или головни каждой в отдельности или обеих вместе, горчака или вязеля каждого в отдельности или обоих вместе не более 0,04 %, а вместе с головней или спорыньей не более 0,05 %; куколя не более 0,1 %.

Методы определения наличия в муке спорыньи сведены в «Правила ветеринарно-санитарной экспертизы растительных пищевых продуктов в лабораториях ветеринарно-санитарной экспертизы рынков».

Реактивы: хлороформ ($\rho = 1,48 \text{ г/см}^3$), этиловый спирт 96 %, серная кислота 20 % раствор, мука, серный эфир, углекислая сода 10 % раствор, мука.

Посуда и приборы: пробирки стеклянные вместимостью 10-20 см³, мерный цилиндр, весы лабораторные технические, пробки резиновые, стеклянный стакан, воронка, бумажные фильтры, весы лабораторные технические, цилиндр мерный.

Ход анализа

1. Качественное определение спорыньи с серной кислотой

В чистую сухую пробирку помещают 1 г муки, приливают 6-8 см³ хлороформа, пробирку закрывают пробкой, содержимое хорошо взбалтывают и отстаивают 30 мин. Песок, минеральные примеси и куколь в виде черных частиц оседают на дно пробирки. Спорынья вместе с частями семян растений и отрубями остается на поверхности. Затем в пробирку добавляют 3-4 см³ 96 % этилового спирта и содержимое вновь перемешивают. Частицы семян сорных растений вместе с отрубями опускаются на дно, а спорынья остается на поверхности. Затем к содержимому пробирки добавляют 3 капли раствора серной кислоты.

Оценка результатов. При наличии спорыньи ее частицы окаймляются розово-фиолетовым кольцом.

2. Качественное определение спорыньи по методу Зинина-Гоффмана

10 г муки смачивают 20 см³ серного эфира. Смесь взбалтывают и оставляют на 6 ч, затем фильтруют и к фильтрату добавляют 1 см³ раствора углекислой соды, снова взбалтывают и отстаивают. После отстаивания смесь отфильтровывают, осадок отбрасывают, фильтрат анализируют по цвету.

Оценка результатов. Оценку результатов осуществляют по цвету фильтрата после отстаивания. При наличии в муке спорыньи фильтрат окрашивается в фиолетовый цвет.

Этот метод позволяет обнаружить спорынью при ее содержании в муке до 0,05 %.

Лабораторная работа №3 Определение свежести мяса

Мясо – источник полноценных белков животного происхождения, необходимых для построения тканей организма человека, синтеза и обмена веществ, а также источник фосфора, принимающего участие в физиологической функции нервной ткани, жира, витаминов группы В, микроэлементов.

В мясе животных содержится в среднем 68-75 % воды, до 20 % белков, 10-11 % жира, до 1 % углеводов, а также ферменты, витамины.

Пищевое достоинство мяса определяется прежде всего наличием в нем белковых комплексов, хорошо сбалансированного состава аминокислот.

Мясо животных после убоя имеет рН 6,6-6,8. По мере созревания в мясе образуется молочная кислота, которая снижает кислотность до рН 5,8. Этому способствует также накопление продуктов ферментативного изменения белков. При порче мяса, которая характеризуется глубокими изменениями аминокислот, в мясе накапливается аммиак и рН повышается.

Реакция на аммиак с реактивом Несслера основана на способности аммиака, аминов и других продуктов распада белка, выделяющихся в процессе разложения азотосодержащих веществ, образовывать с ртутными солями сложные меркурамидные соединения, окрашивающие раствор в желтый цвет. По интенсивности окраски раствора судят о количестве аммиака, характеризующего степень порчи продукта.

Реакция на свободный аммиак по лакмусовой бумажке характерна для неконсервированного мяса. Наличие свободного аммиака свидетельствует о разложении белков мяса. Летучие пары аммиака обнаруживаются лакмусовой бумажкой. При разложении цистина и метионина – аминокислот белка, содержащих серу, выделяется сероводород, который с уксуснокислым свинцом образует сернистый свинец черного цвета. По интенсивности потемнения бумажки, на которой происходит реакция, судят о степени порчи объекта. Однако следует отметить, что вареное мясо или рыба могут дать положительную реакцию на сероводород, будучи доброкачественными.

Реактивы: реактив Несслера (йодистый калий, сулема, едкий калий, дистиллированная вода), уксуснокислый свинец 4 % раствор, едкий натр. 30 % раствор.

Посуда и приборы: коническая колба, мерный цилиндр, воронка для фильтрования, бумажный фильтр, пипетка, химический стакан, часовое стекло, банка с притертой пробкой, красная лакмусовая бумажка, водяная баня.

Ход анализа

Приготовление водной вытяжки. Для приготовления вытяжки пробу мяса освобождают механически от жира и соединительной ткани. Из разных мест проб отбирают навеску массой 10 г, которую грубо измельчают на 40-50 кусочков. Кусочки мяса настаивают в конической колбе в 100 см³ прокипяченной воды в течение 15 мин при трехкратном встряхивании. Полученный водный экстракт фильтруют через бумажный фильтр.

1. Реакция на аммиак с реактивом Несслера

Приготовление реактива Несслера. 10 г йодистого калия растворяют в 10 см³ горячей воды и к этому раствору прибавляют горячий насыщенный раствор сулемы (при 90°С в 100 см³ растворяется 27 г) до тех пор, пока образующийся красный осадок не перестанет растворяться (обычно требуется 4–5 г сулемы). После фильтрования к раствору прибавляют 30 г едкого калия, растворенного в 80 см³ воды, и 1-5 см³ ранее приготовленного раствора сулемы. Охладив раствор, его объем доводят водой до 200 см³, отстаивают, прозрачную часть сливают с осадка и сохраняют ее в колбе с притертой пробкой, защищенной от света. Реактив не должен иметь желтого оттенка.

К 1 мл приготовленной мясной вытяжки прибавляют от 1 до 10 капель реактива Несслера. После прибавления каждой капли пробирку взбалтывают и наблюдают изменение цвета и прозрачности вытяжки.

2. Реакция на свободный аммиак по лакмусовой бумажке

В небольшой химический стакан, покрытый часовым стеклом, помещают на 1/3 объема кусочки исследуемого мяса. Туда же опускают полоску красной лакмусовой бумажки, смоченную водой; бумажку укрепляют на стекле. Стакан ставят на кипящую водяную баню и каждые 5 мин наблюдают за изменением цвета бумажки. Опыт заканчивают через 15 мин. По интенсивности и по скорости посинения бумажки судят о степени свежести продукта.

3. Реакция на сероводород

Приготовление щелочного раствора уксуснокислого свинца. К 4 % раствору уксуснокислого свинца (4 г уксуснокислого свинца растворяют в свежeproкипяченной воде и доливают до 100 см³) прибавляют 30 % раствор едкого натрия (30 г едкого натра растворяют при нагревании в 70 см³ воды) до растворения образовавшегося осадка. Приготовленный раствор нужно хранить в плотно закрытой стеклянной посуде.

В баночку с притертой пробкой емкостью около 80-100 см³ помещают до 1/3 ее объема кусочки исследуемого мяса. Туда же опускают полоску фильтровальной бумаги, смоченной щелочным раствором уксуснокислого свинца. Бумажку зажимают между поверхностью пробки и горлом банки. Исследование ведут при комнатной температуре и прекращают через 15 мин. При наличии сероводорода бумажка окрашивается в светло-бурый или черный цвет.

Оценка результатов. Оценку полученных результатов осуществляют по табл. 6.

Таблица 6. Данные для определения качества мяса

Показатели	Мясо свежее	Мясо подозрительной свежести	Мясо несвежее
рН среды	5,8-6,4 – для охлажденного; 6,0-6,5 – для мороженого	6,5-6,7 – для охлажденного; 6,6-6,7 – для мороженого	6,8 и выше – для охлажденного и мороженого
Реакция на аммиак по Несслеру	Экстракт не мутнеет и не желтеет. Если в редких случаях после прибавления 5 капель появляется пожелтение, то прозрачность не уменьшается и мути не образуется	Экстракт мутнеет после прибавления нескольких капель (6 и более), пожелтение наступает сразу или после стояния помутневшего раствора в течение 20...30 мин	Экстракт мутнеет после прибавления первых капель, после десятой капли появляется сильно желтое или красноватое окрашивание с осадком после отстоя
Реакция на свободный аммиак по лакмусовой бумажке	Отрицательная	Слабо положительная	Резко положительная
Реакция с сероводородом	Отрицательная	Слабо положительная	Резко положительная

Для определения свежести мяса используют органолептические методы по ГОСТ 7269 – 79 «Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести» и методы химического и микроскопического анализа по ГОСТ 23392 – 78 «Мясо. Методы химического и микроскопического анализа свежести».

Контрольные вопросы

1. Как можно определить спорынью в муке?
2. Чем опасна спорынья?
3. Какими методами можно определить свежесть мяса?
4. О чем свидетельствует наличие свободного аммиака в мясе?

Раздел 2. Опасные природные компоненты пищи

2.1. Антиалиментарные факторы питания

Антиалиментарными факторами питания принято называть вещества, не обладающие общей токсичностью, но способные избирательно ухудшать или блокировать усвоение нутриентов. Этот термин распространяется только на вещества природного происхождения, которые являются составными частями натуральных продуктов питания. Перечень антиалиментарных факторов питания достаточно обширен. К ним относятся ингибиторы пищеварительных ферментов, цианогенные гликозиды, биогенные амины, алкалоиды, антивитамины, факторы, снижающие усвоение минеральных веществ, яды пептидной природы, лектины, алкоголь.

В табл. 7 приведены антиалиментарные факторы питания и их основные источники, а также возможные пути устранения их негативного влияния.

Таблица 7. Антиалиментарные вещества

Ингибируемое вещество	Природный антипищевой фактор	Источники и условия действия	Пути устранения влияния
<i>1. Ферменты</i> трипсин, химотрипсин, α -амилаза	Соответствующие белковые ингибиторы	Бобовые злаковые, белок куриного яйца в сыром виде	Тепловая обработка
<i>2. Аминокислоты</i> Лизин, триптофан др.	Редуцирующие сахара	Продукты, содержащие оба вида нутриентов	Рациональное сочетание продуктов, легкая тепловая обработка
Триптофан	Лейцин	Пшено при его избыточном потреблении	Умеренное потребление пшена
<i>3. Витамины</i> Аскорбиновая кислота	Аскорбатоксидаза, полифенолоксидаза, пероксидазы, хлорофилл	Фрукты и овощи при их нарезании и хранении	Использование в целом виде, бланшировка
	Биофлавоноиды, ортодифенолы	Чай, кофе при избыточном потреблении	Ограниченное потребление чая и кофе
Ниацин	Индолилуксусная кислота, ацетилпиридин	Кукуруза при одностороннем питании	Рациональное питание

Ингибируемое вещество	Природный антипищевой фактор	Источники и условия действия	Пути устранения влияния
Биотин	Авидин	Яичный белок в сыром виде	Тепловая обработка
Ретинол	Длительно нагревавшиеся жиры, гидрогенизированные жиры	Пищевые жиры	Легкая тепловая обработка, дозированное потребление маргарина
Токоферол	Полиненасыщенные жирные кислоты	Растительные масла при избыточном потреблении	Потребление в пределах рекомендуемых норм
Кальциферол	Недостаточно идентифицированные вещества	Соя при недостаточной тепловой обработке	Тепловая обработка
4. Минеральные вещества Ca, Mg и некоторые другие катионы	Щавелевая кислота	Щавель, шпинат, ревень, инжир, черника при избыточном потреблении	Увеличение потребления кальция
	Фитин	Бобовые, некоторые крупы, отруби при недостаточной тепловой обработке	Тепловая обработка
		Черный хлеб при избыточном потреблении	Потребление в пределах нормы
Ca, Mg, Na	Кофеин	Кофеин-содержащие напитки	Умеренное употребление
Ca	Избыток фосфора	Зерновые продукты	Продукты, содержащие кальций
Fe	Балластные вещества	Отруби, хлеб грубого помола, многие крупы. Овощи, фрукты при избыточном потреблении	Увеличение потребления источников железа, кальция, фосфора и витамина С

Ингибируемое вещество	Природный антипищевой фактор	Источники и условия действия	Пути устранения влияния
	Дубильные вещества	Чай при избыточном употреблении	Умеренное потребление
I	Серосодержащие соединения	Капуста белокочанная, цветная, кольраби, турнепс, редис, некоторые бобовые, арахис при избыточном употреблении	Ограниченное потребление в условиях недостатка йода в пище

Лабораторная работа №4 Амилолитический ферментный комплекс солода

Тривиальное название ферментов, расщепляющих крахмал, – амилазы. При участии амилаз осуществляется гидролиз крахмала, гликогена, олигосахаридов и других веществ, построенных из остатков α -D-глюкопиранозы и содержащих в молекуле 1,4- и 1,6-гликозидные связи. Различают три основных типа амилаз: α -амилазу, β -амилазу и глюкоамилазу.

В состав амилолитического комплекса растений входят α - и β -амилазы. Семена растений различаются по содержанию амилаз. В непроросших зернах пшеницы и ячменя присутствует только β -амилаза; α -амилаза образуется при прорастании. В зерне ржи присутствуют оба фермента, при прорастании количество и активность α -амилазы возрастает.

В пищевой промышленности растительные амилазы используются в виде солода. Солодом называется проросшее и высушенное зерно. В качестве источника амилаз солод используют в производстве хлебобулочных изделий, полисолодовых экстрактов, пива, хлебного кваса и других безалкогольных напитков.

Помимо α - и β -амилазы, в солоде присутствуют α -глюкозидаза (мальтаза), фосфорилаза, инвертаза (сахараза) и др.

α -Амилаза является эндоферментом и атакует внутренние гликозидные связи в молекуле крахмала. Для ее действия не имеет значения близость или удаленность нередуцирующих концевых остатков, α -амилаза ускоряет гидролиз $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидных связей в молекуле крахмала без какого-либо определенного порядка, но преимущественно в середине цепи. Она не затрагивает $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидные связи, гидролиз прекращается на предпоследней $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидной связи (рис. 2).

небольшого количества глюкозы и декстринов, в которых сосредоточены $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидные связи.

В связи с тем, что в промышленности обычно используют не индивидуальные амилазы, а ферментные препараты, содержащие целый набор ферментов, для оценки их каталитической способности определяют амилолитическую и осахаривающую активность последних.

Под амилолитической активностью понимают способность ферментного препарата гидролизовать крахмал до декстринов. Анализ ведут по качественной реакции с йодом. Амилолитическая активность солода обусловлена главным образом присутствием α -амилазы.

Под осахаривающей активностью амилолитических ферментных препаратов подразумевается их способность ускорять гидролиз крахмала до редуцирующих сахаров. Оценку осахаривающей активности ведут по качественной реакции на редуцирующие сахара (с реактивом Фелинга). Осахаривающая активность солода обусловлена присутствием β -амилазы.

Реактивы: основной раствор солода; основной раствор йода; рабочий раствор йода (приготовленный на 0,1 н. соляной кислоте); реактивы Фелинг I и Фелинг II; индикаторная бумага; 0,15 М раствор гидроортофосфата натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); фосфатный буфер pH 6,0 и 5,6; 0,1 % раствор растворимого крахмала; 0,1 н. раствор соляной кислоты.

Посуда и приборы: конические колбы объемом 100 мл; пробирки; пипетки; мерные цилиндры; водяная баня, ледяная баня, термостат; фотоэлектроколориметр; термометры.

Ход анализа

Приготовление основного раствора йода. 5 г металлического йода и 5 г йодида калия помещают в бюкс, добавляют 2 см³ дистиллированной воды и закрывают притертой крышкой. После полного растворения йода раствор переносят в мерную колбу на 200 см³ с пришлифованной пробкой и объем жидкости доводят до метки дистиллированной водой.

Приготовление рабочего раствора йода. 2 см³ основного раствора разводят 0,1 н. раствором соляной кислоты в мерной колбе вместимостью 100 см³. Оптическая плотность рабочего раствора при длине волны 453 нм в кювете с длиной рабочей грани 10 мм должна быть $0,220 \pm 0,01$.

Построение калибровочной кривой. Для построения калибровочного графика использовать 0,1 % раствор растворимого крахмала. Из исходного раствора крахмала приготовить растворы с уменьшающейся концентрацией по схеме:

- раствор №1: 2 мл (исходного раствора, 1 мг/мл);
 раствор №2: 9 мл (исходного раствора) + 1 мл воды;
 раствор №3: 8 мл (раствора №2) + 1 мл воды;
 раствор №4: 7 мл (раствора №3) + 1 мл воды;
 раствор №5: 6 мл (раствора №4) + 1 мл воды;
 раствор №6: 5 мл (раствора №5) + 1 мл воды;
 раствор №7: 4 мл (раствора №6) + 1 мл воды;
 раствор №8: 3 мл (раствора №7) + 1 мл воды;
 раствор №9: 2 мл (раствора №8) + 2 мл воды;
 раствор №10: 2 мл (раствора №9) + 2 мл воды.

Содержимое пробирок перемешать (в пробирках должно остаться по 2 мл раствора). В каждую пробирку добавить по 2 мл рабочего раствора йода. Содержимое пробирок перемешать и измерить оптическую плотность образовавшегося комплекса крахмал – йод на фотоэлектроколориметре при $\lambda = 670$ нм. Измерения начать с наименее окрашенного раствора.

Для контрольной пробы использовать те же реактивы, только вместо крахмала добавить дистиллированной воды. Полученные данные внести в табл. 8 и построить калибровочную кривую.

Таблица 8. Данные для построения калибровочной кривой

Показатель	Значение									
Крахмал, мг/мл										
Оптическая плотность										

Приготовление основного раствора солода. Солод готовят к анализу, переводя в раствор амилолитические ферменты. Для этого готовят основной (I) и рабочий (II) растворы. Для приготовления основного раствора навеску измельченного свежепросоженного солода (просяного 10 г, ячменного, овсяного или ржаного по 5 г) переносят в коническую колбу на 200 – 250 см³, заливают 10 см³ фосфатного буфера и 90 см³ дистиллированной воды. Смесь выдерживают 1 час при температуре 30°C при периодическом перемешивании стеклянной палочкой, затем фильтруют через складчатый фильтр. Фильтрат представляет собой основной раствор I. Рабочий раствор ферментов солода II готовят из основного раствора, разбавляя его водой так, чтобы в рабочем растворе, введенном в реакцию, содержалось количество ферментов, обеспечивающих гидролиз крахмала в принятых условиях на 20 – 70 %.

Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 4,7-4,9. Отвешивают 11,876 г гидроортофосфата натрия Na₂HPO₄ и 9,079 г дигидрофосфата калия KH₂PO₄. Навески солей растворяют отдельно в дистиллированной воде в колбах на 1 дм³ и доводят содержимое до метки –

получают растворы солей I и II. Для получения буферного раствора с рН 4,85 перед анализом растворы I и II смешивают в соотношении 1 : 1.

Выделение ферментов солода. α -Амилазу выделяют из основного раствора ферментного комплекса солода путем инактивации β -амилазы. В колбу объемом 100 мл поместить 20 мл основного раствора солода и прогреть при 70°C в течение 15 мин. β -Амилаза при указанной температуре инактивируется. Прогретый раствор охладить и использовать в дальнейшем для исследования активности α -амилазы. Так как оптимум активности α -амилазы лежит при рН 5,5-5,8, то после охлаждения к раствору добавить 4 мл фосфатного буфера с рН 5,6.

β -Амилазу выделяют из солодовой вытяжки путем инактивирования α -амилазы в кислой среде. В колбу объемом 100 мл налить 20 мл, основного раствора солода, выдержать в ледяной бане в течение 10 мин и прибавить 1 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты. Полученный раствор оставить в ледяной бане на 15 мин и добавить 3 мл фосфатного буфера с рН 6,0 (оптимальный рН для β -амилазы).

Определение амилолитической активности солода. В штативе расположить пронумерованные пробирки в три ряда. Во все пробирки первого ряда из пипетки налить по 1 мл дистиллированной воды. В первую пробирку внести 1 мл раствора α -амилазы. Содержимое первой пробирки перемешать, продувая воздух из груши через пипетку. Отобрать из первой пробирки пипеткой 1 мл и перенести во вторую пробирку. Из второй пробирки после перемешивания отобрать 1 мл и перенести в третью пробирку. Аналогично методом последовательных разбавлений приготовить растворы в четвертой и пятой пробирках.

В пробирки второго ряда добавить раствор β -амилазы путем последовательного разбавления. В пробирки третьего ряда внести основной раствор ферментного препарата солода. Во всех пробирках должно остаться по 1 мл соответствующим образом разведенных растворов ферментного препарата.

Все пробирки термостатировать при температуре 40°C. Не вынимая пробирки из бани, добавить в каждую по 2 мл 0,1 % раствора крахмала, спустя 10 мин внести по 2 мл рабочего раствора йода (приготовленного на 0,1 н. растворе соляной кислоты). Оптическую плотность окрашенных растворов измерить на фотоэлектроколориметре в кюветах с толщиной 10 мм при светофильтре с длиной световой волны 670 нм.

Остаточную концентрацию крахмала ($C_{\text{ост}}$ мг/мл) в растворе найти по калибровочной кривой (рис. 3).

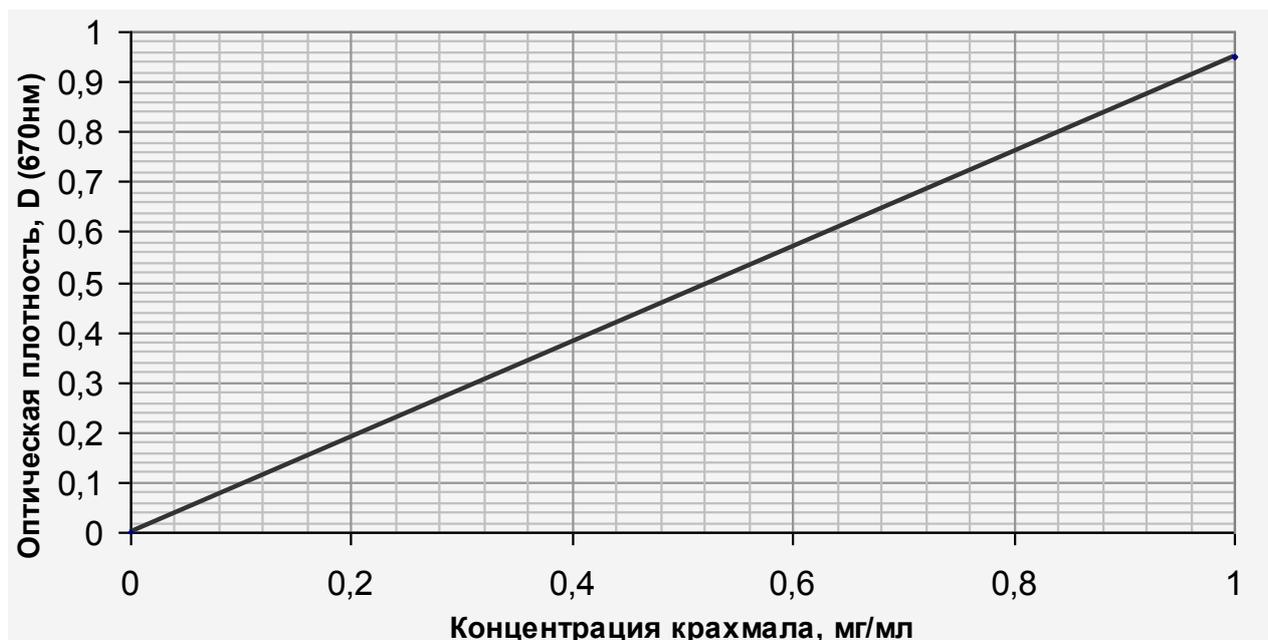


Рис. 3. Калибровочная кривая для определения содержания крахмала

Количество гидролизованного (X мг) крахмала рассчитать по формуле:

$$X = (C_{\text{исх}} - C_{\text{ост}})V,$$

где $C_{\text{исх}}$ – концентрация крахмала в рабочем растворе, мг/мл;

$C_{\text{ост}}$ – остаточная концентрация крахмала в рабочем растворе, найденная по калибровочному графику, мг/мл;

V – объем рабочего раствора крахмала, мл.

Результаты эксперимента оформить в виде табл. 9.

Таблица 9. Схема эксперимента и полученные результаты

Вариант	Кратность разбавления раствора солода	Оптическая плотность			Количество гидролизованного крахмала, мг		
		I	II	III	I	II	III
1	2						
2	4						
3	8						
4	16						
5	32						

Примечание. I – раствор α -амилазы; II – раствор β -амилазы; III – основной раствор ферментного препарата.

Оценить глубину гидролиза и найти оптимальную концентрацию рабочего раствора солода.

Определение осахаривающей активности солода. В три плоскодонные колбы объемом 100 мл внести пипеткой по 10 мл 0,1 % раствора растворимого крахмала, прогреть на водяной бане при температуре 40°C в течение 15 мин. Затем, не вынимая колб из бани, в первую прилить 2 мл раствора α -амилазы, во вторую 2 мл раствора β -амилазы, в третью 2 мл основного раствора солода. Содержимое пробирок перемешать и выдержать при той же температуре 20 мин. По истечении этого времени ферментативный гидролиз остановить, нагрев все три колбы на кипящей водяной бане.

Из всех трех колб отобрать по 1 мл полученных гидролизатов и перенести в отдельные пробирки, в которые заранее внести по 1 мл смеси реактивов Фелинг I и Фелинг II. Полученные растворы прогреть на кипящей бане в течение 5 мин. По интенсивности выпавшего осадка закиси меди оценить глубину гидролиза и количество образовавшихся восстанавливающих сахаров.

На основании полученных данных сделать выводы о различиях в действии α - и β -амилаз.

Лабораторная работа №5 **Ингибиторы амилаз солода**

К группе ингибиторов пищеварительных ферментов относятся вещества белковой природы, блокирующие активность пищеварительных ферментов (пепсин, трипсин, химотрипсин, α -амилаза). Белковые ингибиторы обнаружены в семенах бобовых культур (соя, фасоль и др.), злаковых (пшеница, ячмень и др.), в картофеле, яичном белке и других продуктах животного и растительного происхождения.

Механизм действия этих соединений заключается в образовании стойких комплексов «фермент-ингибитор», подавлении активности главных пищеварительных ферментов, что приводит к снижению усвоения белковых веществ и других микронутриентов.

На основании структурного сходства все белки – ингибиторы растительного происхождения – можно разделить на несколько групп, основными из которых являются ингибиторы:

- протеаз, выделенные из сои;
- протеаз, выделенные из картофеля;
- трипсина/ α -амилазы.

Ингибиторы протеаз, выделенные из сои, можно разделить на две основные группы: ингибиторы Кунитца и ингибиторы Баумана – Бирка. Одна молекула ингибитора Кунитца инактивирует одну молекулу трипсина, а одна молекула ингибитора Баумана – Бирка инактивирует одну молекулу трипсина и химотрипсина, причем с одной молекулой ингибитора могут связываться молекулы обоих ферментов.

Молекулярная масса ингибитора Баумана – Бирка составляет около 8000 дальтон. Молекула ингибитора состоит из 71 аминокислотного остатка. Особенностью аминокислотного состава является высокое содержание остатков цистеина (7 на одну молекулу) и отсутствие остатков глицина и триптофана.

В клубнях картофеля содержится целый набор ингибиторов химотрипсина и трипсина, которые отличаются между собой по своим физико-химическим свойствам (молекулярной массе, особенностям аминокислотного состава, химическим и термодинамическим показателям и т.д.). Кроме картофеля белковые ингибиторы содержатся также в томатах, баклажанах, табаке. Наряду с ингибиторами сериновых протеиназ, в них обнаружены и белковые ингибиторы цистеиновых, аспартильных протеиназ, а также металлоэктопептидаз.

Данные белки отличаются высокой термостабильностью, выдерживают нагрев до 110°C.

В семенах растений и в клубнях картофеля находятся также ингибиторы, способные одновременно связываться и ингибировать протеазу и α -амилазу. Такие белковые ингибиторы были выделены из риса, ячменя, пшеницы, ржи.

В основе определения активности ингибиторов α -амилазы солода лежит количественная оценка убыли крахмала (по йодной пробе) в процессе гидролиза и накопления не окрашиваемых йодом декстринов.

Реактивы: основной раствор солода; рабочий раствор йода (на 0,1 н. соляной кислоте); растворы Фелинг I и Фелинг II; индикаторная бумага; 0,1 % раствор картофельного крахмала.

Посуда и приборы: конические колбы объемом 100 мл; пробирки; мерные цилиндры; водяная баня; ледяная баня; термостат; фотоэлектродиметр; термометр.

Ход анализа

Из основного раствора солода приготовить раствор с оптимальной концентрацией (по данным лабораторной работы №4 «Амилолитический ферментный комплекс солода»). В колбы объемом 100 мл внести рабочий раствор солода и воду согласно табл. 10.

Содержимое колб перемешать и термостатировать при температуре 30°C в течение 20 мин. Не вынимая колб из термостата, внести раствор ингибитора амилазы (картофельный сок) и, спустя 10 мин, 0,1 % раствор крахмала. Полученные растворы перемешать и сразу же отобрать по 2 мл данной смеси в пробирки с 2 мл заранее приготовленного рабочего раствора йода (приготовление рабочего раствора йода описано в лабораторной работе №4 «Амилолитический ферментный комплекс солода»). Продолжить отбор проб аналогичным образом в течение 15 мин (через каждые 5 мин).

Таблица 10. Схема и результаты эксперимента

Состав раствора, мл				Время гидролиза	Оптическая плотность	Количество гидролизованного крахмала, мг
Раствор солода	Ингибитор	Вода	Крахмал (0,1%)			
1,0	0,0	4,0	5,0	0		
				5		
				10		
1,0	1,0	3,0	5,0	0		
				5		
				10		
1,0	0,5	3,5	5,0	0		
				5		
				10		
1,0	0,2	3,8	5,0	0		
				5		
				10		

Измерить оптическую плотность полученных окрашенных растворов на фотоэлектроколориметре, найти остаточную концентрацию крахмала по рис. 3 и рассчитать количество гидролизовавшегося крахмала (X мг):

$$X = (C_{\text{исх}} - C_{\text{ост}})V,$$

где V – объем исследуемой пробы, мл; $C_{\text{исх}}$ – исходная концентрация крахмала в исследуемой пробе, мг/мл; $C_{\text{ост}}$ – остаточная концентрация, мг/мл.

Рассчитать ингибирующую активность (A %) по формуле:

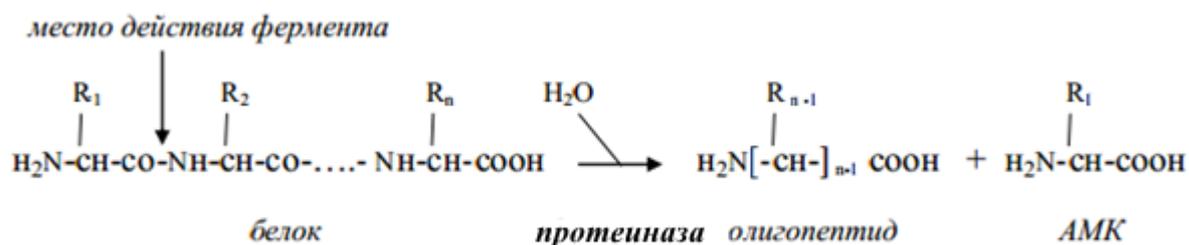
$$A = 100(X_1 - X_2) / X_1,$$

где X_1 – количество гидролизовавшегося крахмала в отсутствие ингибитора, мг; X_2 – количество гидролизовавшегося крахмала в пробе, мг; 100 – коэффициент пересчета в проценты.

Полученные результаты внести в табл. 10. Оценить полученные результаты, оформить выводы по работе.

Лабораторная работа №6 Белковые ингибиторы протеиназ

Протеолитические ферменты (протеиназы и пептидазы) катализируют расщепление пептидной связи белков и полипептидов. Белок под действием протеаз превращается в пептоны, полипептиды, конечным продуктом являются аминокислоты:



В тканях различных органов (поджелудочной железе, легких, слюнных железах), сыворотке крови, других биологических жидкостях человека и животных, а также в растениях содержатся ингибиторы белковой или полипептидной природы, которые вызывают либо полное торможение, либо частичное ограничение ферментативных функций ряда протеиназ. Они являются фактором регуляции активности ферментов протеолиза, различаются молекулярной массой, аминокислотным составом, специфичностью действия. Общим свойством этих молекул является способность образовывать с ферментами комплексы. Образование комплекса сопровождается обратимым подавлением протеолитической активности фермента. Широкое распространение ингибиторов в живой природе свидетельствует, что подавление протеолитической активности этими молекулами является универсальным и весьма важным способом регуляции метаболизма у всех организмов.

В состав белкового комплекса бобовых для предотвращения гидролиза запасных белков входят специальные ингибиторы белковой природы. Они предположительно препятствуют гидролизу запасных веществ до начала прорастания и регулируют активность протеаз в период прорастания. При прорастании ингибиторы диффундируют во внешнюю среду, препятствуя инфицированию семян микроорганизмами.

В основе определения активности ингибиторов протеаз лежит количественная оценка тирозина (спектрофотометрическим методом), образующегося в продуктах протеолиза. Для осаждения негидролизованых белков применяют тепловую денатурацию. В качестве белковых ингибиторов протеаз можно использовать водные вытяжки из семян фасоли, ячменя, пшеницы.

Реактивы: 0,5 % раствор альбумина, приготовленный на фосфатно-цитратном буфере pH 8,0; 0,1 % раствор трипсина; 0,1 % раствор пепсина; семена фасоли, ячменя, пшеницы.

Посуда и приборы: конические колбы объемом 100 мл; пробирки; пипетки; водяная баня; термостат; аналитические весы; спектрофотометр (с кюветами).

Ход анализа

1. Выделение белковых ингибиторов из семян фасоли, ячменя и пшеницы. 5 г предварительно размолотого на мельнице растительного материала экстрагировать дистиллированной водой (в соотношении 1:10) при интенсивном перемешивании в течение 5 мин. Экстракт центрифугировать в

течение 10 мин при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость использовать в дальнейшем в качестве ингибитора протеаз.

2. Определение ингибирующей активности. Для анализа взять две колбы объемом 100 мл. В первую из них налить 2 мл раствора протеазы и 8 мл раствора ингибитора (опытная проба), во вторую – 2 мл раствора протеазы и 8 мл дистиллированной воды (контрольная проба). Поместить обе колбы в термостат с температурой 30°C на 10 мин. Не вынимая колб из термостата, добавить в каждую по 10 мл субстрата (0,5 % раствор альбумина, заранее подогретого до 30°C). Полученные растворы перемешать и сразу же отобрать по 4 мл в заранее приготовленные пробирки. Отбор проб продолжить (по 4 мл) в течение 30 мин (через каждые 10 мин) с момента внесения раствора альбумина.

Отобранные пробы продуктов протеолиза сразу поместить в кипящую водяную баню на 5 мин для денатурации негидролизованного белка. Содержимое пробирок с анализируемыми образцами охладить и отфильтровать. Количество тирозина в фильтратах определить спектрофотометрическим методом. Для этого к 1 мл каждого фильтрата добавить по 9 мл 0,85 % раствора хлорида натрия и измерить оптическую плотность при $\lambda = 280$ относительно контрольного раствора. В качестве контроля использовать 0,85 % раствор хлорида натрия. Рассчитать ингибирующую активность A по формуле, %:

$$A = \frac{D - D_0}{D} 100,$$

где D – оптическая плотность контрольной пробы (в отсутствие ингибитора); D_0 – оптическая плотность опытной пробы; 100 – коэффициент пересчета в проценты.

Полученные результаты внести в табл. 11, оформить выводы по работе.

Таблица 11. Результаты эксперимента

Наименование протеазы	Время гидролиза, мин	Оптическая плотность	Ингибирующая активность, %
Пепсин	0		
	10		
	20		
	30		
Трипсин	0		
	10		
	20		
	30		
Картофельный сок	0		
	10		
	20		
	30		

Лабораторная работа №7

Определение щавелевой кислоты в плодово-ягодных соках и винах

Помимо чужеродных соединений, загрязняющих пищевые продукты, и природных токсикантов необходимо учитывать действие веществ, не обладающих общей токсичностью, но способных избирательно ухудшать или блокировать усвоение нутриентов. Эти соединения принято называть антиалиментарными факторами питания. Этот термин распространяется только на вещества природного происхождения, которые являются составными частями натуральных продуктов питания. К факторам, снижающим усвоение минеральных веществ, в первую очередь, следует отнести щавелевую кислоту (НООС-СООН) и ее соли (оксалаты).

Значительные количества щавелевой кислоты содержат некоторые овощи и в меньшей степени фрукты (табл. 12).

Таблица 12. Содержание щавелевой кислоты в продуктах растительного происхождения

Продукт	Содержание, мг/100 г
Шпинат	1000
Щавель	500
Ревень	800
Свекла столовая	275
Портулак	1300
Чай	300-2000
Бобы какао	500

Щавелевая кислота в растительном сырье содержится в свободном и связанном состоянии. Попадая в организм, свободная щавелевая кислота связывает кальций, обедняя им организм. Деминерализующий эффект щавелевой кислоты обусловлен образованием практически нерастворимых в воде соединений с солями кальция (1 часть по массе кальция связывается 2,2 частями щавелевой кислоты). Поэтому продукты, содержащие значительное количество щавелевой кислоты, способны резко снизить усвоение кальция в тонком кишечнике и даже послужить причиной тяжелых отравлений.

Влияние щавелевой кислоты на усвоение кальция в значительной степени зависит от содержания в каждом из продуктов кальция и оксалатов. С этой точки зрения наиболее неблагоприятным эффектом обладают шпинат, портулак, листья свеклы, щавель, ревень, в которых содержание щавелевой кислоты примерно в 10 раз выше, чем кальция. Действие щавелевой кислоты на обмен кальция столь сильно, что она может обладать выявленной токсичностью. Смертельная доза щавелевой кислоты для взрослых людей колеблется от 5 до 15 г и зависит от ряда факторов. Установлено, что интоксикация щавелевой кислотой проявляется в большей степени на фоне дефицита витамина D. Щавелевая кислота угнетает также поступление кальция

в организм из молока и молочных продуктов, служащих основным источником легкоусвояемого кальция. Несмотря на значительное содержание оксалатов в чае и какао, сравнительно небольшое их количество, которое потребляет население, позволяет отрицать сколько-нибудь существенную опасность их декальцинирующего эффекта. Острая токсичность оксалатов проявляется в появлении разъедающего действия во рту и желудочно-кишечном тракте, которое иногда вызывает серьезное кровотечение. Отравление оксалатами сопровождается также поражением почек и судорогами.

При фальсификации продуктов, в частности вин, когда подкисление проводят щавелевой кислотой, или от избыточного потребления продуктов с высоким содержанием щавелевой кислоты возможны случаи с летальным исходом. Смертельная доза для взрослых колеблется от 5 до 15 г и зависит от ряда факторов.

Содержание щавелевой кислоты в виноматериалах может достигать 300 мг/дм³, в вине – до 250 мг/дм³.

Метод определения щавелевой кислоты в плодово-ягодных соках и винах позволяет определить содержание щавелевой кислоты в присутствии винной и лимонной кислот (ГОСТ 14252-73 «Вина и виноматериалы, соки плодово-ягодные спиртованные. Методы определения титруемых кислот»).

Реактивы: реактив для осаждения щавелевой кислоты, борная кислота, 0,1 н. раствор KMnO_4 , 1 % раствор щавелевой кислоты, 10 % раствор аммиака, 1 % раствор AgNO_3 , сок или вино.

Посуда и приборы: водяная баня, электроплитка, мерная колба на 500 см³, колба коническая на 250 см³, химические стаканы на 100 см³, пипетки на 5 и 50 см³, бюретка на 5 см³, воронки диаметром 8-10 см, фильтры бумажные, бумага универсальная индикаторная.

Ход анализа

1. Приготовление реактива для осаждения щавелевой кислоты.

Реактив для осаждения щавелевой кислоты состоит из двух растворов:

а) 25 г безводного CaCl_2 помещают в мерную колбу на 500 см³, растворяют в небольшом количестве воды (50-60 см³) и доводят до метки 50 % уксусной кислотой;

б) 330 г кристаллогидрата $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 300 см³ воды.

Оба раствора смешивают и оставляют на 2 суток при температуре 3-7°C и затем фильтруют.

2. Подготовка пробы. Отбирают 70-100 см³ сока или вина и тщательно фильтруют через плотный фильтр до полной прозрачности. Слабоокрашенные соки и вина после фильтрации непосредственно используют для анализа. В случае анализа труднофильтруемых соков их разбавляют дистиллированной водой в 5 раз, что учитывается в расчетах. Темноокрашенные соки и вина (вишня, черешня) после фильтрации разбавляют в 2-5 раз до получения слабо-розовой окраски, что учитывается в дальнейших расчетах.

Сульфитированные соки и вина при содержании общей сернистой кислоты более 30 мг/дм^3 после фильтрации дисульфитируют путем упаривания на водяной бане до половины объема с последующим доведением до исходного объема дистиллированной водой. Если при этом образцы помутнеют, их подвергают повторной фильтрации.

Для определения необходимости разбавления или упаривания проводят контрольное определение с добавкой известного количества щавелевой кислоты (например, к 50 см^3 исходного образца добавляют $1-5 \text{ см}^3$ 1 н. раствора щавелевой кислоты в зависимости от предполагаемого разбавления).

3. Проведение анализа. Для осаждения щавелевой кислоты в колбу на 250 см^3 помещают 50 см^3 сока или вина, подготовленных как указано выше, прибавляют до слабощелочной реакции (рН 8 по индикаторной бумаге) аммиак и $1-2 \text{ г}$ H_3BO_3 (борную кислоту вводят с целью затруднения осаждения солей лимонной и винной кислот) и взбалтывают до полного ее растворения. Затем добавляют 10 см^3 реактива для осаждения щавелевой кислоты и оставляют на 48 ч при температуре $3-7^\circ\text{C}$ или выдерживают не менее 16 ч при 0°C . Выпавший осадок щавелево-кислого кальция отфильтровывают через бумажный фильтр и промывают горячей водой ($70-90^\circ\text{C}$) до отрицательной реакции на хлорид-ионы (отсутствие осадка при внесении нескольких капель 1 % раствора AgNO_3).

Промытый осадок щавелево-кислого кальция осторожно смывают с фильтра водой из промывалки в колбу, затем промывают фильтр последовательно $10-15 \text{ см}^3$ горячей воды ($70-90^\circ\text{C}$) и 10 % раствором серной кислоты в эту же колбу, чтобы растворить следы оксалата, оставшиеся на фильтре. Осадок в промывной колбе растворяют при легком перемешивании. При затруднении растворения осадка колбу нагревают. Затем фильтр дополнительно промывают $20-30 \text{ см}^3$ горячей воды и полученный фильтрат титруют 0,1 н. раствором перманганата калия до появления розовой окраски.

Содержание безводной щавелевой кислоты ($X \text{ г/дм}^3$) находят по формуле:

$$X = a \cdot 0,0045 \cdot 20,$$

где a – объем 0,1 н. раствора KMnO_4 , пошедший на титрование, мл;

20 – пересчет исходного объема раствора на 1 дм^3 ;

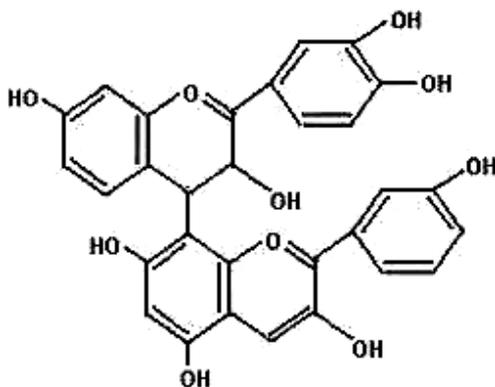
0,0045 – количество кислоты, соответствующее 1 см^3 точно 0,1 н. раствора KMnO_4 , г.

Оценить полученные результаты, оформить выводы по работе.

Примечание. При разбавлении сока или вина результаты умножают на коэффициент разбавления. Точность метода составляет $\pm 10 \%$. Минимальная определяемая концентрация 10 мг/дм^3 .

Лабораторная работа №8 Определение содержания танина в чае

Танины (галлодубильные кислоты, дубильные кислоты) – фенольные соединения, включающие большое число гидроксильных групп. Широко распространены в растительном царстве. По химическому строению танин представляет собой гликозид, состоящий из глюкозы и остатков дигалловой кислоты. Характеризуются дубящими свойствами и специфическим вяжущим вкусом.



танин

Вяжущее действие танина связано с его способностью вызывать осаждение белков с образованием плотных альбуминатов, которые при нанесении на слизистые оболочки или на раневую поверхность вызывают частичное свертывание белков слизи или раневого экссудата и приводят к образованию пленки, защищающей от раздражения чувствительные нервные окончания подлежащих тканей. При этом происходит местное сужение сосудов, ограничение секреции, уплотнение клеточных мембран, что приводит к уменьшению воспалительной реакции.

В желудке танин соединяется с белковыми веществами и в малых количествах поступает в кишечник, поэтому его действие проявляется только в начальном отделе тонкого кишечника в течение 3-24 ч.

С солями алкалоидов и тяжелых металлов танин образует нерастворимые соединения, а с некоторыми алкалоидами (морфин, кокаин, атропин, никотин, физостигмин) – нестойкие соединения.

Метод основан на окислении танина чая перманганатом калия в присутствии индигокармина в качестве индикатора (ГОСТ 19885-74 «Чай. Методы определения содержания танина и кофеина»).

Реактивы: раствор индигокармина; калия перманганат, 0,1 н. раствор; кислота серная, 10% раствор.

Посуда и приборы: конические колбы объемом 250 мл; аналитические весы; водяная баня; стеклянная палочка; бюретка для титрования.

Ход анализа

1. Подготовка к проведению анализа. 2,5 г предварительно измельченной навески чая, взятой для анализа с точностью 0,0001 г, помещают в колбу на 250 мл, приливают 200 мл кипящей дистиллированной воды и ставят на водяную баню. Экстракцию проводят в течение 45 мин. Экстракт фильтруют через складчатый фильтр и переносят в мерную колбу на 250 мл, охлаждают и доводят до метки водой.

2. Проведение анализа.

2.1. Холостой опыт. 25 мл индигокармина и 750 мл водопроводной воды с добавлением 10 мл 10 % раствора серной кислоты титруют стандартным 0,1 н. раствором перманганата калия в кристаллизаторе, непрерывно помешивая раствор стеклянной палочкой. Синяя окраска при этом постепенно переходит через сине-зеленую, темно- и светло-зеленую, желто-зеленую в желтую золотистого оттенка. Конец реакции определяют по исчезновению зеленого оттенка и появлению желтого цвета. Определяют объем KMnO_4 , пошедшего на титрование воды и индигокармина.

2.2. Определение содержания танина. Пипеткой отбирают 10 мл экстракта чая из мерной колбы, помещают в кристаллизатор, добавляют 750 мл водопроводной воды, 25 мл индигокармина, 10 мл раствора серной кислоты (10 %) и титруют 0,1 н. раствором перманганата калия при постоянном перемешивании стеклянной палочкой. Затем подсчитывают количество KMnO_4 , израсходованного на окисление танина. Определяют объем KMnO_4 , пошедшего на титрование танина.

3. Расчет массовой доли танина. Содержание танина в чае определяют по формуле:

$$A = \frac{(a - a_1)0,004157V}{V_1 \cdot m} 100,$$

где a – объем 0,1 н. раствора перманганата калия, израсходованного на окисление танина, мл;

a_1 – объем 0,1 н. раствора перманганата калия, израсходованного на титрование раствора воды и индигокармина, мл;

0,004157 – количество танина, окисляемое 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия, г;

V – объем полученного экстракта чая, мл;

V_1 – объем экстракта чая, взятый для испытания, мл;

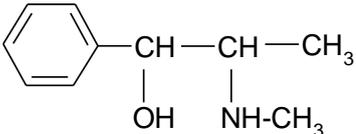
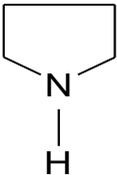
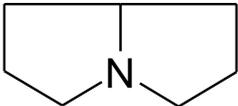
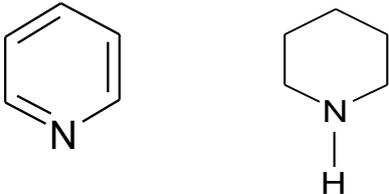
m – масса навески сухого чая, г.

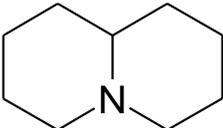
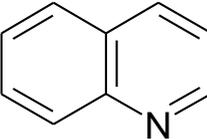
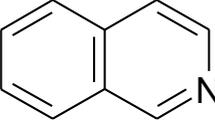
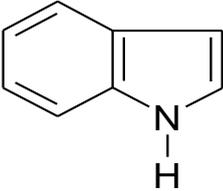
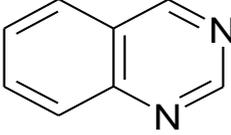
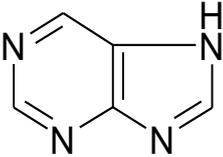
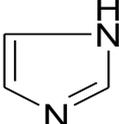
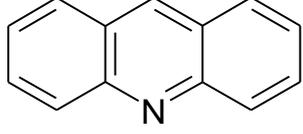
Оценить полученные результаты, оформить выводы по работе.

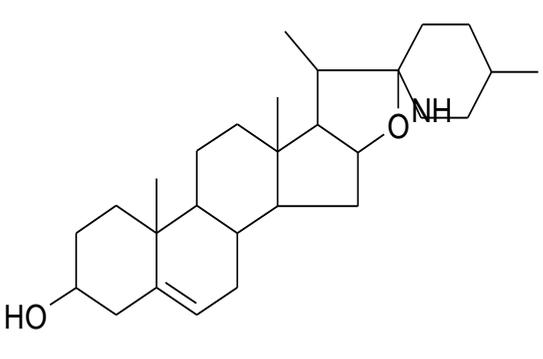
2.2. Алкалоиды

Алкалоиды – весьма обширный класс органических соединений, оказывающих самое различное влияние на организм человека. Это и сильнейшие яды, и полезные лекарственные средства. Алкалоидами принято называть азотсодержащие органические соединения гетероциклического строения, обладающие ярко выраженным физиологическим действием на организм человека и животных. Они являются продуктами обмена веществ в растениях. В большинстве случаев алкалоиды находятся в растении в виде солей органических и неорганических кислот. Локализуются преимущественно в определенных частях (органах) растений, например, у хинного дерева – главным образом в коре, у аконита – в клубнях, у кокаинового куста – в листьях. Содержание алкалоидов в тканях обычно составляет десятые–сотые доли процента и редко достигает до 10-15 % (кора хинного дерева).

Из-за большого разнообразия алкалоидов существуют различные типы классификаций. Наиболее часто применяемой и правильной с точки зрения химии является классификация алкалоидов по Орехову. Согласно его классификации, алкалоиды делятся на 13 групп в зависимости от углеродного скелета. Некоторые группы встречаются редко и поэтому не изучаются.

 <p>Эфедрин</p>	Ациклические алкалоиды с азотом в боковой цепи (без гетероциклов)
 <p>Пирролидин</p>	Производные пирролидина
 <p>Пирролизидин</p>	Производные пирролизидина
 <p>Пиридин пиперидин</p>	Производные пиридина и пиперидина

 Хинолизин	Производные хинолизидина
 Хинолин	Производные хинолина
 Изохинолин	Производные изохинолина
 Индол	Производные индола
 Хиназолин	Производные хиназолина
 Пурин	Производные пурина
 Имидазол	Производные имидазола
 Акридин	Производные акридина

 <p>Соласодин</p>	<p>Стероидные гликоалкалоиды</p>
--	----------------------------------

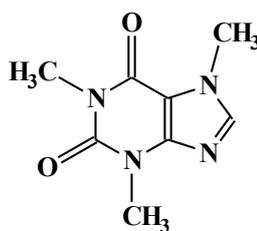
Алкалоиды почти все горькие на вкус. В небольшом количестве многие из них производят возбуждающее действие на нервную систему, в больших же дозах они часто являются весьма ядовитыми. Из-за возбуждающего действия растения, содержащие алкалоиды, издавна употреблялись то для приготовления напитков (чай, кофе – ради кофеина, какао – ради теобромона), то для курения (табак, опиум), то для жевания (листья коки). Злоупотребление некоторыми алкалоидами ведет к очень тяжелым последствиям.

Лабораторная работа №9 **Определение массовой доли кофеина фотометрическим методом**

Кофеин – (1,3,7-триметилксантин) алкалоид, относящийся к соединениям группы метилксантинов, содержащийся в зернах кофе, листьях чая, орехах кола; $T_{пл} = 235–237^{\circ}C$, растворим в хлороформе, медленно растворяется в воде; стимулирует деятельность центральной нервной системы.

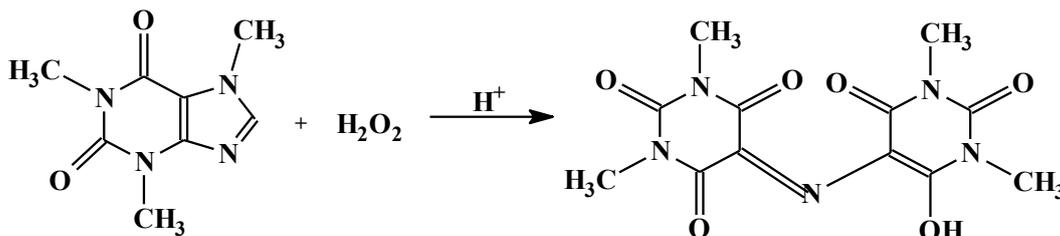
Содержание кофеина в сырье и различных продуктах колеблется в достаточно широких пределах. В зернах кофе и листьях чая, в зависимости от вида сырья, от 1 до 4 %; в напитках кофе и чая, в зависимости от способа приготовления, до 1500 мг/л (кофе) и до 350 мг/л (чай). В напитках пепси-кола и кока-кола до 1000 мг/л и выше. Здесь уместно подчеркнуть, что пуриновые алкалоиды при систематическом употреблении их на уровне 1000 мг в день вызывают у человека постоянную потребность в них, напоминающую алкогольную зависимость.

Токсическая доза, подтвержденная летальным исходом, составляет 10 г, хотя известен один документированный случай выживания после инъекции 24 г.



кофеин

Фотометрический метод основан на гидролитическом окислении кофеина в тетраметилпурпуровую кислоту (ТМПК) и последующем фотометрическом измерении интенсивности окраски ее раствора.



Метод применим при содержании кофеина в растворе от 10 мкг/см³ до 30 мкг/см³. Проводится на основании ГОСТ 19885-74 «Чай. Методы определения содержания танина и кофеина».

Реактивы: соляная кислота, х.ч., 3 М раствор; калия гидроокись, х.ч., 3 М (15 %); перекись водорода, х.ч., свежеприготовленный 15 % раствор; хлороформ, х.ч.

Посуда и приборы: коническая колба объемом 100мл; термометр; делительная воронка; пипетка; аналитические весы; водяная баня; колориметр; фарфоровая чаша.

Ход анализа

1. Определение влажности кофе. Навеску молотого кофе, массой 2-3 г, взвешенную с точностью 0,01 г, переносят в предварительно высушенный до постоянной массы бюкс и помещают в сушильный шкаф. Образец высушивают до постоянной массы при температуре $T = 105^{\circ}\text{C}$. Сравнивают массу образца кофе после высушивания и массу, полученную при предварительном взвешивании.

Массовую долю влаги в кофе W рассчитывают по формуле, %:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1} 100,$$

где m_1 – масса кофе до высушивания, г;

m_2 – масса кофе после высушивания, г.

2. Подготовка к проведению анализа. Навеску массой 2,00 г помещают в стакан, заливают 100 см³ кипящей дистиллированной воды и кипятят 5 мин. Полученную суспензию охлаждают до 18-20^oC, количественно переносят в

мерную колбу вместимостью 100 см³ и доливают дистиллированной водой до метки. Содержимое колбы взбалтывают и отстаивают 2-3 мин, затем фильтруют. Полученный фильтрат используют для анализа.

3. Проведение анализа. Анализ проводят, внося в делительную воронку вместимостью 25 см³ последовательно 10-15 см³ хлороформа, 2 см³ фильтрата и 0,5 см³ 15 % раствора гидроксида калия. Воронку закрывают притертой пробкой и проводят экстракцию, осторожно многократно переворачивая содержимое воронки в течение 1 мин. После расслаивания системы нижний хлороформный слой осторожно переносят в выпарительную чашку. Хлороформ отгоняют на водяной бане досуха.

К сухому остатку, содержащему кофеин, прибавляют последовательно 1,0 см³ 3 М раствора соляной кислоты, смывая остаток на дно чашки, и 0,2 см³ раствора перекиси водорода. Содержимое чашки перемешивают вращательным движением, выдерживают 20 мин при комнатной температуре, затем нагревают на кипящей водяной бане до получения сухого окрашенного остатка ТМПК.

Для приготовления водного раствора ТМПК в чашку к сухому остатку, охлажденному до комнатной температуры, приливают 5-10 см³ дистиллированной воды и оставляют до его полного растворения. Полученный раствор пурпурного цвета количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят объем раствора до метки. Оптическую плотность полученного раствора определяют на колориметре, используя кюветы толщиной поглощающего свет слоя 3 см при длине волны 540 нм.

4. Обработка результатов.

Массовую долю кофеина X_4 вычисляют по формуле, % в пересчете на сухое вещество:

$$X_4 = \frac{1,03cV_\phi V}{10^6 V_3 m} \frac{100}{100 - W} 100,$$

где 1,03 – коэффициент, учитывающий полноту извлечения кофеина хлороформом на первом этапе экстракции;

$c = 60D$ – концентрация кофеина в фотометрируемом растворе, мкг/см³;

60 – коэффициент пропорциональной зависимости оптической плотности раствора от его концентрации в растворе;

D – оптическая плотность анализируемого раствора ТМПК;

$V_\phi = 25$ – объем фотометрируемого раствора ТМПК, получаемый в результате гидролитического окисления кофеина, см³;

$V = 100$ – объем раствора кофе для анализа, см³;

106 – коэффициент перевода 1 мкг в 1 г;

V_3 – объем раствора кофе, используемый для экстракции, см³;

m – масса навески кофе, г;

W – массовая доля влаги анализируемой навески кофе, %.

Сравнить полученные результаты с требованиями, предъявляемыми к кофе согласно ГОСТ, и сделать вывод о качестве анализируемых образцов кофе.

Лабораторная работа №10

Экстракционно-фотометрическое определение кофеина в чае

Алкалоиды – весьма обширный класс органических соединений, оказывающих самое различное действие на организм человека. Это и сильнейшие яды, и лекарственные средства. Структурная формула кофеина представлена в лабораторной работе №9 настоящего лабораторного практикума.

Методика основана на получении хлороформного экстракта из чая и на способности кофеина, содержащегося в экстракте, поглощать лучи в ультрафиолетовой области спектра ($\lambda = 272$ нм). Сопутствующие компоненты (танины, пигменты и др.) не мешают определению кофеина в чае. Проводится на основании ГОСТ 19885-74 «Чай. Методы определения содержания танина и кофеина».

Реактивы: кофеин; хлороформ.

Посуда и приборы: пять конических колб объемом 25 мл; коническая колба объемом 50 мл; пробирки; пипетка; водяная баня; аналитические весы; спектрофотометр (с кюветами).

Ход анализа

1. Построение градуировочного графика. Для построения градуировочного графика в пять мерных колб по 25 мл каждая последовательно вносят 0; 0,1; 0,25; 0,5 и 0,75 мл стандартного раствора кофеина (стандартный раствор кофеина готовят следующим образом: в мерную колбу объемом 25 мл вносят (25 ± 1) мг кофеина, растворяют в хлороформе, доводят до метки и перемешивают. 1 мл приготовленного раствора содержит 1 мг кофеина). В каждую колбу добавляют хлороформ до метки и перемешивают. Получают серию растворов, содержащих в 50 мл соответственно 0; 0,2; 0,5; 1,0 и 1,5 мг кофеина.

Предварительно проверяют чистоту хлороформа относительно дистиллированной воды. Оптическую плотность растворов измеряют при $\lambda = 272$ нм; контроль – хлороформ. По полученным данным строят градуировочный график в координатах: содержание кофеина, мг/50 мл – оптическая плотность раствора.

2. Проведение анализа. На аналитических весах взвешивают пробу сухого чая массой 1-1,5 г, помещают в колбу (50 мл) с шлифованной пробкой, приливают 30 мл хлороформа, содержимое колбы перемешивают в течение 1 ч. Экстракт переносят в мерную колбу на 50 мл. Отстоявшуюся после

экстрагирования пробу чая промывают небольшими порциями хлороформа, которые присоединяют к экстракту в мерной колбе, добавляют хлороформ до метки и перемешивают.

Полученную жидкость фильтруют, 2,5 мл прозрачного раствора фильтрата помещают в мерную колбу на 25 мл, разбавляют хлороформом до метки и перемешивают. Измеряют оптическую плотность раствора; контроль – хлороформ. По градуировочному графику находят содержание кофеина в миллиграммах на 2,5 мл разбавленного экстракта.

3. Расчет массовой доли кофеина. Содержание кофеина в чае вычисляют по формуле:

$$W = \frac{q \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 5 \cdot 1000} = \frac{q}{m},$$

где W – массовая доля кофеина в чае, % ;

q – найденное по градуировочному графику содержание кофеина в экстракте, мг/2,5 мл;

m – масса навески чая, г;

50 – объем экстракта, мл.

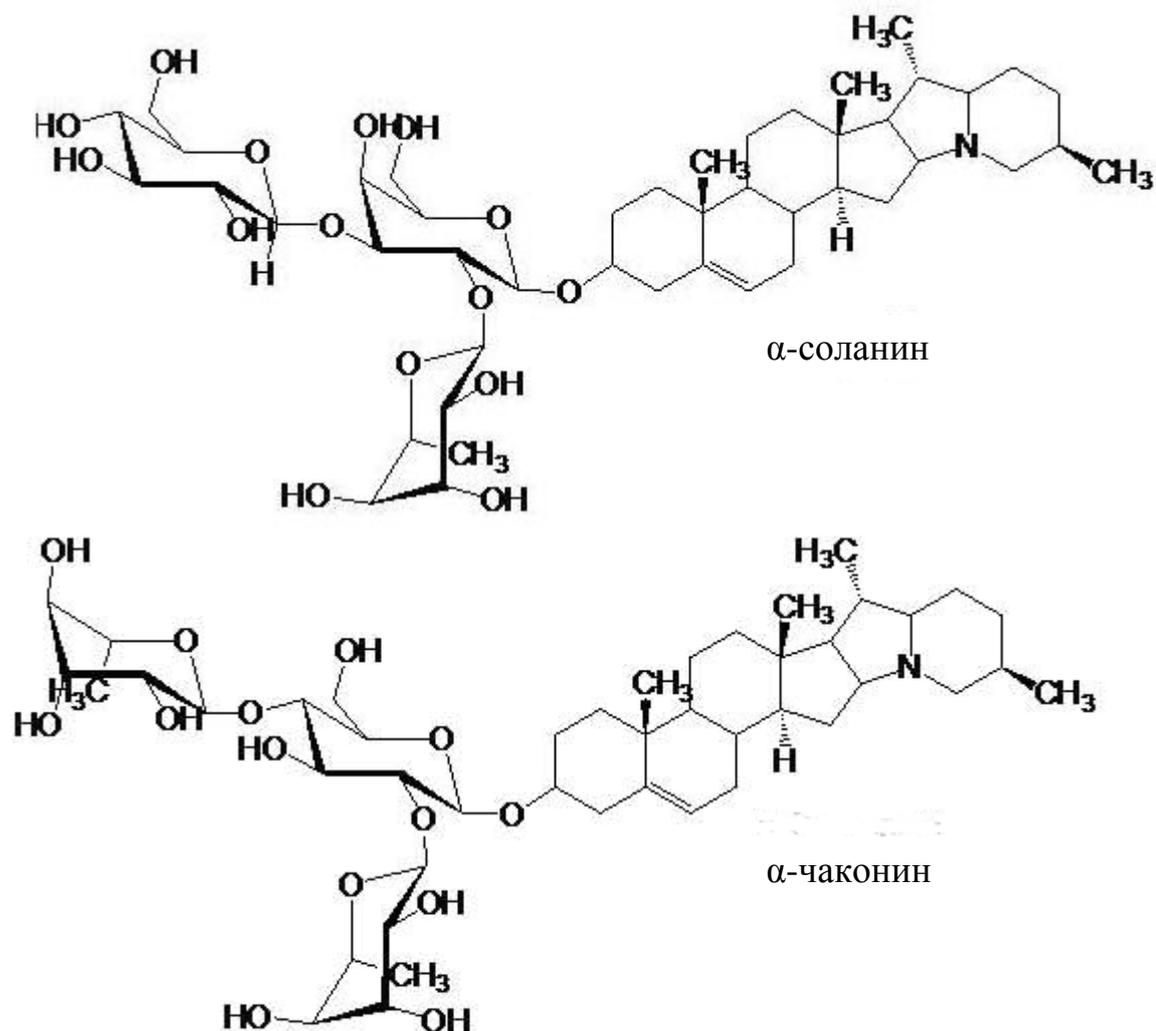
Оценить полученные результаты, оформить выводы по работе.

Лабораторная работа №11 **Определение соланина в картофеле**

К группе стероидных алкалоидов относятся соланины и чаконины. Иначе их называют гликоалкалоидами, они содержат один и тот же агликон (соланидин), но различные остатки сахаров. Соланин – глюкозид, распространенный в растениях из семейства пасленовых. В картофеле обнаружены шесть гликоалкалоидов, одним из которых является α -соланин.

Ввиду сильной ядовитости этого вещества распределение его в картофеле были предметом целого ряда исследований; содержание соланина в нормальном не проросшем картофеле достигает по новейшим определениям 0,05 %; в очищенном картофеле содержание его приблизительно в три раза ниже, из чего следует, что соланин сосредоточен в наружных частях клубня; при прорастании количество соланина заметно увеличивается, причем он сосредоточивается главным образом в проростках, достигая содержания свыше 0,1 %.

Структурная формула α -соланина и α -чаконина:



Особенности состава других гликоалкалоидов картофеля видны из сопоставления их структурных компонентов:

α -соланин: соланидин + галактоза + глюкоза + рамноза;

β -соланин: соланидин + галактоза + глюкоза;

γ -соланин: соланидин + галактоза;

α -чаконин: соланидин + глюкоза + рамноза + рамноза;

β -чаконин: соланидин + глюкоза + рамноза;

γ -чаконин: соланидин + глюкоза.

Таким образом, гликоалкалоиды картофеля близки по составу и являются промежуточными продуктами при биосинтезе α -соланина.

Это вещества средней токсичности, их накопление в клубнях картофеля (в позеленевших частях клубня их количество может увеличиваться и достигать 500 мг/кг) придает горький вкус и вызывает типичные признаки отравления. Эти соединения обладают антихолинэстеразной активностью. Соланины и чаконины могут содержаться в баклажанах, томатах, табаке.

Соланин при реакции с крепкой уксусной кислотой, концентрированной серной кислотой и перекисью водорода дает интенсивное темно-малиновое или красное окрашивание.

Реактивы: кислота уксусная концентрацией 80-90 %; кислота серная плотностью 1,84 г/см³; перекись водорода концентрированная 30 %. Для приготовления рабочего 5 % раствора концентрированную перекись водорода разбавить дистиллированной водой в соотношении 1:5. Раствор использовать в день приготовления.

Посуда и приборы: чашка фарфоровая вместимостью 25 см³, пипетки вместимостью 1 и 5 см³, колба коническая вместимостью 50 см³, цилиндр измерительный вместимостью 25 см³.

Ход анализа

С клубня картофеля сделать несколько срезов толщиной около 1 мм: продольные (от верхушки до основания по плоскости, делящей клубень на равные половинки); поперечные (у основания и у верхушки клубня); с боков; на участках около глазков.

Срезы поместить в фарфоровую чашку. На них нанести по каплям вначале крепкую уксусную кислоту (80-90 %), затем концентрированную серную кислоту и несколько капель 5 % перекиси водорода. Почти немедленно в местах среза, содержащих соланин, появится интенсивное темно-малиновое или красное окрашивание.

По результатам опыта сделать заключение о возможности использования картофеля для пищевых целей.

Раздел 3. Антропогенные токсины

3.1. Токсичные элементы

Токсичные элементы, в частности некоторые тяжелые металлы, составляют обширную и весьма опасную в токсикологическом отношении группу веществ. Обычно рассматривают 14 элементов: Hg, Pb, Cd, As, Sb, Sn, Zn, Al, Be, Fe, Cu, Ba, Cr, Tl.

Разумеется, не все перечисленные элементы являются ядовитыми; некоторые из них необходимы для нормальной жизнедеятельности человека и животных, поэтому часто трудно провести четкую границу между биологически необходимыми и вредными для здоровья человека веществами.

В большинстве случаев реализация того или иного эффекта зависит от концентрации элемента. При превышении оптимальной физиологической концентрации в организме может наступить интоксикация, а дефицит многих

элементов в пище и воде может привести к достаточно тяжелым и трудно распознаваемым явлениям недостаточности.

Зависимость вредного или полезного действия некоторых элементов от концентрации показана на рис. 4.

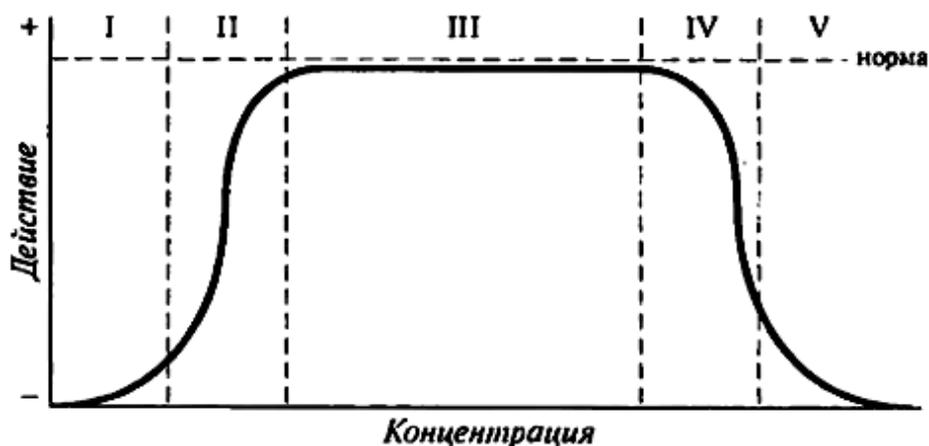


Рис. 4. Влияние некоторых элементов на организм человека в зависимости от концентрации: I – угрожающее действие; II – дефицитное действие; III – физиологическое действие; IV – токсическое действие; V – летальное действие

Для веществ, относящихся к так называемым супертоксикантам, плато, характеризующее норму, отсутствует (или очень короткое), а крутизна нисходящей ветви характеризует токсичность вещества (рис. 5).

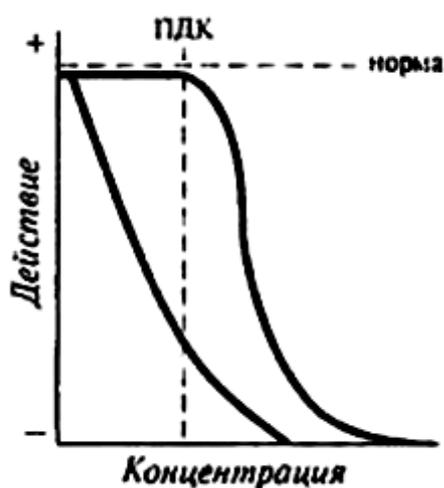


Рис. 5. Действие токсичных элементов

Загрязнение водоемов, атмосферы, почвы, сельскохозяйственных растений и пищевых продуктов токсичными металлами происходит за счет:

- выбросов промышленных предприятий (особенно угольной, металлургической и химической промышленности);
- выбросов городского транспорта (имеется в виду загрязнение свинцом от сгорания этилированного бензина);
- применения в консервном производстве некачественных внутренних покрытий и нарушения технологии припоев;
- контакта с оборудованием (для пищевых целей допускается весьма ограниченное число сталей и других сплавов).

Для большинства продуктов установлены предельно допустимые концентрации (ПДК) токсичных элементов, к детским и диетическим продуктам предъявляются более жесткие требования.

Наибольшую опасность из вышеназванных элементов представляют ртуть (Hg), свинец (Pb), кадмий (Cd).

Лабораторная работа №12

Определение железа в вине с железистосинеродистым калием

Почти все пищевые продукты содержат железо в самых разных количествах. Железо является необходимым микроэлементом.

Железо поступает в организм человека с пищей. К продуктам питания, богатым железом, относятся печень, чернослив, фасоль, горох, гречневая крупа, а также овсяная крупа, ржаной хлеб, мясо, яйца, шоколад, шпинат, яблоки, абрикосы. Содержание усвояемого железа в продуктах животного происхождения составляет 10-20 % всего содержащегося в них железа, в растительных продуктах 1-6 %. У взрослого человека потребность в железе определяется необходимостью компенсации его потерь, а также степенью усвоения железа из пищи. Потребность в железе у женщин на 30-90% выше, чем у мужчин. При беременности потребность в железе возрастает примерно на 60 %. Всасывание железа увеличено при железодефицитных состояниях. Рекомендуемая норма потребления с пищей для мужчин 10 мг/сут., для женщин 12 мг/сут.

Плохо всасывается в кишечнике железо органических соединений; всасывание железа снижается и за счет образования его нерастворимых солей (так, при избытке в рационе неорганического фосфора, образующего с железосодержащими веществами нерастворимые соединения, может развиваться железодефицитная анемия). Наиболее усвояемой формой железа является ионизированное Fe (II), поэтому всасыванию железа способствует наличие соляной кислоты, вызывающей его ионизацию, и восстановителей, например аскорбиновой кислоты, способствующих восстановлению Fe (III) до Fe (II), а также веществ, которые могут связывать железо, образуя с ним усвояемые комплексы (в желудке — специфического гликопротеина, в кишечнике — алоферритина и аминокислот, содержащих сульфгидрильные группы).

Несмотря на наличие в организме этих механизмов повышения усвояемости железа пищи, практическая потребность в железе в 5-10 раз превышает действительную физиологическую потребность в нем.

Основная часть всосавшегося в кишечнике железа поступает в кровотоки, а затем в костный мозг, где используется главным образом для синтеза гемоглобина. Поступающее в эпителиальные клетки слизистой оболочки кишечника Fe (II) быстро окисляется до гидроксида Fe (III), который соединяется с апоферритином, поэтому всасывание железа слизистой оболочкой кишечника лимитируется связывающей способностью апоферритина. Депонирование железа происходит в печени, где оно практически полностью находится в составе ферритина. Пути выведения избытка железа отсутствуют: при превышении емкости ферритинового депо избыток железа аккумулируется в печени и других органах в виде гранул гемосидерина, содержащих до 37 % железа (по массе).

Несмотря на то, что поглощение железа тщательно регулируется содержанием металла в организме, иногда может поглощаться избыточное количество железа. В результате этого металл накапливается в организме, развивается болезнь – сидероз. Концентрация железа 7-35 г/сут. является летальной для человека, 200 мг/сут. – токсичной.

Поэтому гигиеническими нормами предусматривается контроль содержания железа в пищевой продукции. Загрязнение пищевых продуктов железом может происходить через сырье при контакте с металлическим оборудованием и тарой, что обуславливает соответствующие меры профилактики.

Определение железа в виноградных, плодовых, шампанских, игристых винах, виноматериалах, коньяках и коньячных спиртах производится в соответствии с ГОСТ 13195-73 «Вина, виноматериалы, коньяки и коньячные спирты. Соки плодово-ягодные спиртованные» колориметрическим методом с железосинеродистым калием».

Метод основан на образовании комплексного соединения берлинской лазури синего цвета при взаимодействии ионов трехвалентного железа с железистосинеродистым калием в кислой среде.

Реактивы: кислота серная концентрированная, кислота азотная концентрированная; кислота соляная, раствор с массовой концентрацией 100 г/дм³; калий железистосинеродистый (желтая кровяная соль), раствор с массовой концентрацией 10 г/дм³; квасцы железоаммонийные; перекись водорода (пергидроль); вода дистиллированная; соки, виноматериалы, вино.

Посуда и приборы: колориметр фотоэлектрический весы лабораторные технические, колбы на 100 и 1000 см³; пипетки на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50 и 100 см³; цилиндр на 250 см³; колбы Кьельдаля на 100 и 250 см³, тигли фарфоровые; воронки; стаканчики для взвешивания; водяная баня; бумажные фильтры беззольные.

Ход анализа

1. Приготовление основного раствора железа с массовой концентрацией $0,1 \text{ г/дм}^3$. Навеску $0,8640 \text{ г}$ железоаммонийных квасцов растворяют в $100\text{--}200 \text{ см}^3$ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 , добавляют 4 см^3 серной кислоты и доводят дистиллированной водой до метки.

2. Построение градуировочного графика. Для приготовления растворов сравнения в мерные колбы вместимостью 100 см^3 вносят $0,5; 0,8; 1,0; 1,3; 1,5; 1,7; 2,0 \text{ см}^3$ основного раствора железоаммонийных квасцов. В каждую колбу добавляют 5 см^3 раствора соляной кислоты, одну каплю пергидроля, 4 см^3 раствора железистосинеродистого калия и доводят до метки дистиллированной водой. Массовая концентрация железа в полученных растворах сравнения составляет $0,5; 0,8; 1,0; 1,3; 1,5; 1,7; 2,0 \text{ мг/дм}^3$. Через 30 мин измеряют оптическую плотность растворов сравнения на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре с $X = (600 \pm 10) \text{ нм}$ в кювете с расстоянием между рабочими гранями 20 мм . В качестве контрольного раствора берут дистиллированную воду.

При анализе коньяков и коньячных спиртов для приготовления растворов сравнения берут $0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50$ и $2,00 \text{ см}^3$ основного раствора и все дальнейшие операции проводят так же, как для вин. Массовая концентрация железа в полученных растворах составляет $0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50$ и $2,00 \text{ мг/дм}^3$. При измерении оптической плотности используют кювету с расстоянием между рабочими гранями 30 мм .

Градуировочный график проверяют при каждой смене реактивов. Массовую концентрацию железа в винах, соках плодово-ягодных спиртованных, виноматериалах, коньяках и коньячных спиртах определяют в тех же кюветах и на том же светофильтре, которые использовали для построения градуировочного графика.

Проведение анализа. 1. Перед проведением анализа вина, соки плодово-ягодные спиртованные, виноматериалы, коньяки или коньячные спирты фильтруют через бумажный фильтр.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 отмеривают в зависимости от массовой концентрации железа $5, 10$ или 20 см^3 отфильтрованного вина, сока плодово-ягодного спиртованного или 50 см^3 коньяка или коньячного спирта, добавляют 5 см^3 раствора соляной кислоты, одну каплю пергидроля и 4 см^3 раствора железистосинеродистого калия. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой и через 30 мин колориметрируют относительно контрольного раствора. Для приготовления контрольного раствора такое же количество испытуемого вина, сока плодово-ягодного спиртованного, виноматериала, коньяка или коньячного спирта помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 , добавляют 5 см^3 раствора соляной кислоты, одну каплю пергидроля и доводят до метки дистиллированной водой. Контрольный раствор готовят одновременно с испытуемым раствором. Если массовая концентрация

железа в коньяке или коньячном спирте равна предельно допустимой концентрации или выше ее, то определение производят, как указано в п. 2.

2. При арбитражных анализах красные вина, красные плодово-ягодные спиртованные соки, виноматериалы, коньяки и коньячные спирты должны быть подвергнуты озолению сухим способом.

3. Для сухого озоления в фарфоровый тигель или кварцевую чашку отмеривают в зависимости от массовой концентрации железа 5, 10 или 20 см³ отфильтрованного красного вина, плодово-ягодного спиртованного сока, виноматериала или 10 см³ коньяка, коньячного спирта.

Содержимое чашки или тигля выпаривают досуха на водяной бане, затем осторожно озоляют в муфельной печи или на пламени горелки. Если остаются обуглившиеся частицы, трудно поддающиеся минерализации, то чашку или тигель охлаждают, золу смачивают несколькими каплями дистиллированной воды, подсушивают на водяной бане и вновь подвергают сжиганию. После полной минерализации чашку (тигель) охлаждают, золу растворяют в 0,5-1 см³ раствора соляной кислоты. Раствор с промывными водами переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 4 см³ раствора соляной кислоты, одну каплю пергидроля и 4 см³ раствора железистосинеродистого калия. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой и через 30 мин колориметрируют, применяя в качестве контрольного раствора дистиллированную воду.

4. Для мокрого озоления отмеривают в колбу Кьельдаля в зависимости от массовой концентрации железа 5, 10 или 20 см³ отфильтрованного красного вина, плодово-ягодного спиртованного сока, виноматериала или 100 см³ коньяка или коньячного спирта, выпаривают на слабом огне почти досуха, добавляют 2 см³ серной кислоты и вновь осторожно нагревают, чтобы избежать сильного вспенивания. После почернения всей смеси и прекращения вспенивания содержимое колбы охлаждают, вносят 1 см³ азотной кислоты и вновь нагревают до прекращения выделения бурых паров оксидов азота и обесцвечивания раствора. Если раствор темнеет при охлаждении, то в него вносят 1 см³ азотной кислоты и вновь нагревают. Бесцветный охлажденный раствор из колбы Кьельдаля переносят с промывными водами в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 5 см³ раствора соляной кислоты, одну каплю пергидроля и 4 см³ раствора железистосинеродистого калия. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой и через 30 мин колориметрируют. В качестве контрольного раствора берут раствор, полученный при контрольном сжигании. При контрольном сжигании в колбу Кьельдаля вносят 5 см³ дистиллированной воды, а серной и азотной кислот столько, сколько было добавлено для озоления испытуемой пробы. После удаления оксидов азота и охлаждения содержимое колбы Кьельдаля переносят с промывными водами в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют растворы соляной кислоты, пергидроля, железистосинеродистого калия в тех же количествах, что и в испытуемую пробу, и содержимое колбы доводят дистиллированной водой до метки.

Оценка результатов

Массовую концентрацию железа в винах, виноматериалах, коньяках и коньячных спиртах X вычисляют по формуле, мг/дм³:

$$X = AK,$$

где A – массовая концентрация железа в испытуемом растворе, найденная по градуировочному графику, мг/дм³; K – кратность разбавления вина, виноматериала, коньяка, коньячного спирта.

Вычисление проводят до первого десятичного знака для виноматериалов и вин, плодово-ягодных и спиртованных соков и до второго десятичного знака – для коньяков и коньячных спиртов. За результат анализа: принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений и округляют для виноматериалов и вин, плодово-ягодных спиртованных соков до целого числа, для коньяков и коньячных спиртов – до первого десятичного знака.

Допускаемое относительное расхождение между результатами двух параллельных определений по отношению к среднему арифметическому для виноматериалов и вин, плодово-ягодных спиртованных соков при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должно превышать 4 %. Допускаемое абсолютное расхождение между результатами двух параллельных определений для коньяков и коньячных спиртов при доверительной вероятности $P = 0,95$ не должно превышать 0,08 мг/дм³.

Лабораторная работа №13 Определение жесткости воды

Свойства продуктов, их вкус, цвет, стойкость при хранении во многом зависят от качества используемой в технологическом процессе воды. Она должна отвечать высоким органолептическим показателям: быть прозрачной, бесцветной, не иметь привкусов, запахов, не содержать вредных минеральных и органических примесей и патогенных микроорганизмов. В ней должно содержаться минимальное количество продуктов распада органических азотистых веществ и неорганических примесей.

Общее содержание солей в питьевой воде – минерализация – весьма важный фактор нормальной жизнедеятельности человеческого организма. Сухой остаток воды, обусловленный общим содержанием в ней минеральных солей, должен быть не более 500-850 мг/л.

Окисляемость воды характеризует наличие органических веществ (гуминов, продуктов распада белка), солей железа (II), нитритов и сульфидов; она не должна превышать 6 мг O₂/л.

Важным показателем при оценке воды для практического использования является жесткость, которая обусловлена растворенными в ней солями кальция и магния. Общая жесткость складывается из временной и постоянной жесткости и характеризует концентрацию в воде катионов кальция и магния:

$$Ж_0 = Ж_в + Ж_п.$$

Временная, или карбонатная жесткость, обуславливается присутствием бикарбонатов кальция $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ и магния $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ и устраняется кипячением воды. При кипячении бикарбонаты переходят в нерастворимые или труднорастворимые карбонаты с выделением диоксида углерода по уравнению:



Под постоянной (некарбонатной) жесткостью понимают содержание в воде прочих солей кальция и магния (сульфаты, хлориды, фосфаты, силикаты), она не устраняется кипячением.

Жесткость воды выражают в миллиграмм-эквивалент растворимых солей кальция и магния в 1 л воды. 1 мг-экв жесткости соответствует 20,04 мг ионов кальция и 12,16 мг ионов магния. Следовательно:

$$J_0 = J_{\text{Ca}} + J_{\text{Mg}}.$$

Соли, обуславливающие жесткость, не являются вредными, но они делают воду непригодной для использования в технологическом процессе приготовления пищи. В жесткой воде пищевые продукты плохо развариваются. Вода с повышенной карбонатной жесткостью непригодна для технологических нужд.

Природные воды по жесткости классифицируются следующим образом (в мг-экв Ca^{2+} /л или мг-экв Mg^{2+} /л): очень мягкая 0-1,5; мягкая 1,5-3,0; средняя 3-6; жесткая 6-9; очень жесткая – более 9. Допустимой жесткостью для хозяйственно-питьевого водоснабжения считается жесткость не более 7 мг-экв/л.

Использование жесткой воды в пищевой промышленности ведет к ухудшению качества готовых продуктов, вызывает выпадение солей при хранении, образование подтеков на поверхностях и т. п. Жесткая питьевая вода горьковата на вкус и оказывает отрицательное влияние на органы пищеварения. По нормам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) оптимальная жесткость воды составляет 1,0-2,0 мг-экв/л.

Гигиенические требования к чистоте питьевой воды и централизованных систем водоснабжения определяются санитарными правилами и нормами СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водопользования» (табл. 13).

Под общей жесткостью питьевой воды понимают сумму содержащихся в воде бикарбонатов, карбонатов, гидратов и солей других слабых кислот, вступающих в реакцию с соляной кислотой с образованием хлористых солей щелочных и щелочно-земельных металлов. Для определения жесткости воды используют титриметрические методы с применением комплексонов, способных связывать ионы кальция и магния.

Комплексонометрический метод определения жесткости воды основан на образовании устойчивых и хорошо растворимых в воде внутрикомплексных соединений катионов металлов с натриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (трилон Б) в щелочной среде.

Таблица 13. Показатели химического состава воды

Показатель	СанПиН 2.1.4.1074-01	ВОЗ
Водородный показатель (рН)	6,0-9,0	6,5-8,5
Общая жесткость, мг-экв/л	7,0	2,5
Общая минерализация (по NaCl), мг/л	1000	Не нормируется
Железо общее, мг/л	0,3	0,3
Хлориды, мг/л	350	250
Сульфаты, мг/л	500	250
Марганец, мг/л	0,1	0,1
Кальций, мг/л	180	135
Магний, мг/л	50	50
Аммоний, мг/л	2,5	1,5
Фториды, мг/л	1,2-1,5	1,5
Сероводород, мг/л	0,003	-

Первоначально ионы кальция или магния образуют комплекс с индикатором (мурексидом или эриохромом черным Т), в процессе титрования его вытесняют трилоном Б, который образует устойчивые внутримолекулярные комплексы с металлами с изменением окраски раствора.

После определения общей жесткости соли кальция осаждают оксалатом аммония в виде оксалата кальция и в фильтрате определяют магниевую жесткость:



Кальциевую жесткость рассчитывают по разности между общей и магниевой жесткостью. Определение проводят на основании ГОСТ 31954-2012 «Вода питьевая. Методы определения жесткости».

Реактивы: аммиачно-аммонийный буферный раствор (рН 9,3); буферный раствор (для определения магниевой жесткости); смесь эриохрома черного Т с хлоридом натрия; 0,1 н. раствор трилона Б; 5 % раствор оксалата аммония; 1 % раствор гидрохлорида гидроксиламина; 1 % раствор сульфата натрия.

Посуда и приборы: колбы для титрования; мерные цилиндры; пипетки; воронки; бюретки.

Ход анализа

Определение общей жесткости воды. В колбу для титрования внести 100 мл отфильтрованной анализируемой воды (суммарное содержание кальция и магния не должно превышать 0,005 моль/мл), добавить 5 мл буферного раствора, 5-7 капель металлоиндикатора (эриохром черный Т) или приблизительно 0,1 г его сухой смеси с хлоридом натрия. Полученный раствор оттитровать 0,1 н. раствором трилона Б до перехода красной окраски раствора в синюю.

Нечеткое изменение окраски раствора в эквивалентной точке указывает на присутствие солей меди и цинка. Для устранения их мешающего влияния повторить испытания, добавив к анализируемой пробе воды 1-2 мл 1 % раствора сульфата натрия.

На присутствие солей марганца в воде указывает постепенное обесцвечивание (изменение окраски до серого цвета) анализируемой пробы после добавления буферного раствора и индикатора. Для устранения их мешающего влияния повторить испытания, добавив к исследуемой пробе воды 5 капель 1 % раствора гидрохлорида гидроксилamina.

Общую жесткость J_0 , рассчитать по формуле, мг-экв/л:

$$J_0 = 0,1 V_1 \cdot 1000/V,$$

где V_1 – объем 0,1 н. раствора трилона Б, пошедшего на титрование, мл; 0,1 – нормальность раствора трилона Б; V – объем анализируемой пробы, мл; 1000 – коэффициент пересчета.

Определение кальциевой и магниевой жесткости воды. В плоскодонную колбу внести 10-100 мл исследуемой воды, 1 мл специального буферного раствора и 10-15 мл 5% раствора оксалата аммония. Выпавший осадок оксалата кальция отфильтровать через беззольный фильтр в колбу для титрования, осадок на фильтре промыть дистиллированной водой. К фильтрату добавить 5 мл аммонийно-аммиачного буферного раствора (рН 9,3), 5-7 капель раствора индикатора (или сухой смеси) и оттитровать 0,1 н. раствором трилона Б. Магниевую жесткость J_{Mg} , рассчитать по формуле, мг-экв/л:

$$J_{Mg} = 0,1 V_2 \cdot 1000/V,$$

где V_2 – объем 0,1 н. раствора трилона Б, пошедшего на титрование фильтрата после осаждения оксалата кальция, мл;

0,1 – нормальность раствора трилона Б;

V – объем пробы, взятой на анализ, мл;

V_2 – объем раствора трилона Б, пошедший на титрование, мл;

1000 – коэффициент пересчета.

Кальциевую жесткость J_{Ca} вычислить по формуле, мг-экв/л:

$$J_{Ca} = J_0 - J_{Mg}.$$

Рассчитать концентрации ионов кальция ($[C_{Ca}]$ мг/л) и магния ($[C_{Mg}]$ мг/л):

$$[C_{Ca}] = 20,04 J_{Ca},$$

$$[C_{Mg}] = 12,16 J_{Mg},$$

где 20,4; 12,16 — мг-эквиваленты ионов кальция и магния.

Результаты эксперимента оформить в виде таблицы (табл. 14).

Таблица 14. Результаты эксперимента

Наименование пробы	Концентрация, мг/л		Жесткость, мг-экв/л		
	Ca ⁺²	Mg ⁺²	общая	кальциевая	магниевая

Сделать вывод по проделанной работе.

3.2. Загрязнение веществами, применяемыми в растениеводстве

Остатки сельскохозяйственных ядохимикатов представляют наиболее значительную группу загрязнителей, так как присутствуют почти во всех пищевых продуктах. В эту группу загрязнителей входят:

- 1) пестициды;
- 2) удобрения;
- 3) регуляторы роста растений;
- 4) средства против прорастания;
- 5) средства, ускоряющие созревание плодов.

К числу наиболее опасных химических средств, с точки зрения загрязнения продуктов питания, относят пестициды.

Пестициды – вещества различной химической природы, применяемые в сельском хозяйстве для защиты культурных растений от сорняков, вредителей и болезней, т.е. химические средства защиты растений.

Пестициды различаются по сферам применения: инсектициды – против насекомых – вредителей; фунгициды – против микрогрибов; бактерициды – против бактерий; акарициды – против клещей; родентициды – против грызунов.

Особую группу составляют дефолианты – средства для удаления листьев и ботвы.

Мировое производство пестицидов (в пересчете на активные вещества) составляет более 2 млн т в год, причем эта цифра непрерывно растет. В настоящее время в мировой практике используют около 10 тыс. наименований пестицидных препаратов на основе 1500 действующих веществ, которые относят к различным химическим группам. Наиболее распространены следующие: хлорорганические, фосфорорганические, карбаматы, ртутьорганические, синтетические пиретроиды и медьсодержащие фунгициды.

С гигиенических позиций принята следующая классификация пестицидов:

- *по токсичности* при однократном поступлении через желудочно-кишечный тракт пестициды делятся на сильнодействующие ядовитые вещества (ЛД₅₀ до 50 мг/кг), высокотоксичные (ЛД₅₀ от 50 до 200 мг/кг), среднетоксичные (ЛД₅₀ от 200 до 1000 мг/кг) и малотоксичные (ЛД₅₀ более 1000 мг/кг);

- *кумулятивным свойствам* пестициды делятся на вещества, обладающие свержкумуляцией (коэффициент кумуляции меньше 1). Коэффициент кумуляции – отношение суммарной дозы препарата при многократном

введении к дозе, вызывающей гибель животного при однократном введении; выраженной кумуляцией (коэффициент кумуляции от 1 до 3); умеренной кумуляцией (коэффициент кумуляции от 3 до 5); слабовыраженной кумуляцией (коэффициент кумуляции более 5);

- *стойкости* пестициды делятся на очень стойкие (время разложения на нетоксичные компоненты свыше 2 лет), стойкие (от 0,5 до 1 года), умеренно стойкие (от 1 до 6 месяцев), малостойкие (1 месяц).

Нарушения гигиенических норм хранения, транспортировки и применения пестицидов, низкая культура работы с ними приводят к их накоплению в кормах, продовольственном сырье и пищевых продуктах, а способность аккумулироваться и передаваться по пищевым цепям – к их широкому распространению и негативному влиянию на здоровье человека. Применение пестицидов и их роль в борьбе с различными вредителями в повышении урожайности сельскохозяйственных культур, их влияние на окружающую среду и здоровье человека вызывают неоднозначные оценки различных специалистов.

Интересна судьба открытого в 1939 году швейцарцем Паулем Мюллером инсектицида, известного как ДДТ.

Препарат токсичен: ЛД₅₀ – 200 мг/кг, ПДК в воздухе – 0,1 мг/м³, ПДК в воде – 0,1 мг/л, допустимые остатки в почве – 1,0 мг/кг, в овощах и фруктах – 0,5 мг/кг, в других продуктах не допускается.

ДДТ сыграл огромную роль в борьбе с малярией, и в 1948 году Пауль Мюллер был удостоен Нобелевской премии в области медицины за свое открытие.

Однако уже с 1950 г. начали поступать сообщения о токсических свойствах ДДТ и реальной угрозе с его стороны для здоровья человека. Благодаря своей стойкости и летучести (период обращения вокруг Земли составлял всего 3–4 недели), ДДТ оказался одним из первых глобальных загрязнителей. Он был обнаружен на всех континентах, в том числе и в Антарктиде. Его способность аккумулироваться и передаваться по пищевым цепям привела к тому, что он был обнаружен в жировом слое пингвинов и в грудном молоке женщин. Все это способствовало тому, что уже в 60-х гг. XX в. в большинстве стран препарат был запрещен (в СССР с 1970 г.).

В настоящее время споры о применении или же полном запрете пестицидов продолжаются. Ученые разных областей науки (химии, аграрии, медики) – каждый со своих позиций приводят убедительные доводы как за, так и против. Очевидно, что лишь общие усилия помогут найти правильное решение этой сложнейшей проблемы.

С 1986 г. в нашей стране действует автоматизированный мониторинг, обеспечивающий информацию об уровнях пестицидов и других хлорорганических соединений в продуктах питания. В частности, при мониторинге определяются остаточные количества 154 пестицидов, относящихся к 45 группам в 262 видах пищевых продуктов, принадлежащих к 23 классам.

Результаты мониторинга последних лет показывают возрастание общего содержания пестицидов в продуктах растительного и животного происхождения. Особенно это касается таких продуктов, как картофель, репчатый лук, капуста, помидоры, огурцы, морковь, свекла, яблоки, виноград, пшеница, ячмень, рыба прудов и водохранилищ, молоко. В них обнаруживается наиболее широкий спектр пестицидов. Причем повышение допустимого уровня содержания пестицидов в 5 и более раз следует понимать как экстремальное загрязнение, а оно наблюдается, к сожалению, в широком ассортименте продуктов питания.

Данные мониторинга свидетельствуют о реальной опасности комбинированного воздействия на организм человека множества высокотоксичных пестицидов; позволяют оценить степень такой нагрузки и определить необходимость первоочередных мер по испытанию и профилактике.

Очевидно, что полностью отказаться от применения пестицидов невозможно, поэтому очень важен контроль за производством и применением пестицидов со стороны различных ведомств и организаций, а также информация населения о неблагоприятном воздействии этих соединений на организм человека.

Однако в решении проблемы, связанной с негативным влиянием пестицидов на организм человека, существуют свои объективные трудности. Пестициды, поступающие в организм с пищевыми продуктами, подвергаются биотрансформации, и это затрудняет их обнаружение и осложняет раскрытие механизмов воздействия на человека. Кроме того, промежуточные продукты биотрансформации ксенобиотиков бывают более токсичны, чем первоначальный ксенобиотик, и в связи с этим огромное значение приобретает опасность отдаленных последствий.

Лабораторная работа №14

Определение нитратов в плодах и овощах

Нитраты широко распространены в природе, они являются нормальными метаболитами любого живого организма как растительного, так и животного; даже в организме человека в сутки образуется и используется в обменных процессах 100 и более миллиграммов нитратов.

При потреблении в повышенном количестве нитраты в пищеварительном тракте частично восстанавливаются до нитритов $\text{NO}^{3-} \rightarrow \text{NO}^{2-}$. Механизм токсического действия нитритов заключается в их взаимодействии с гемоглобином крови и образовании метгемоглобина, неспособного связывать и переносить кислород. 1 мг нитрита натрия может перевести в метгемоглобин около 2000 мг гемоглобина. Кроме того, из нитритов в присутствии аминов могут образовываться N-нитрозамины, обладающие канцерогенной активностью. Допустимая доза нитратов для взрослого человека составляет 325 мг/сутки.

Основными источниками поступления нитратов и нитритов в организм человека являются, прежде всего, растительные продукты. И поскольку нитраты являются нормальным продуктом обмена азота в растениях, то их содержание зависит от следующих факторов:

- индивидуальных особенностей растений: существуют так называемые «растения – накопители нитратов» - это, в первую очередь, листовые овощи, а также корнеплоды, например, свекла и др.;

- степени зрелости плодов: незрелые овощи, картофель, а также овощи ранних сроков созревания могут содержать нитратов больше, чем достигшие нормальной уборочной зрелости;

- возрастающего и часто бесконтрольного применения азотистых удобрений (имеется в виду неправильная дозировка и сроки внесения удобрений);

- использования некоторых гербицидов: например, 2,4-Д (дихлорфеноксисукусная кислота) при дефиците молибдена в почве приводит к нарушению обмена веществ в растениях, способствует накоплению нитратов.

Помимо растений источниками нитратов и нитритов для человека являются мясные продукты, а также колбаса, рыба, сыры, в которые добавляют нитрит натрия или калия в качестве пищевой добавки как консервант или для сохранения привычной окраски мясопродуктов, так как образующийся при этом NO – миоглобин сохраняет красную окраску даже после тепловой денатурации, что существенно улучшает внешний вид и товарные качества мясопродуктов.

Содержание нитратов в продуктах питания приведено в табл. 15.

Наиболее простым и экспрессным методом определения нитратов является ионометрический, но его можно применять только при контроле свежей растительной продукции.

Более универсальным методом, пригодным при анализе нитратов как в сырье, так и в готовой продукции, является фотометрический метод.

Сущность ионометрического метода (ГОСТ 29270-95 «Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения нитратов») состоит в извлечении нитратов из анализируемого материала раствором алюмокалиевых квасцов с последующим измерением их концентрации в полученной вытяжке, с помощью ионоселективного электрода. Для ускорения анализа вместо вытяжки может быть использован сок продукции, разбавленный раствором алюмокалиевых квасцов. При анализе капусты для разрушения примесей, мешающих определению нитратов, дополнительно проводят их окисление марганцовокислым калием. Нижний предел обнаружения нитратов – 6 мг на 1 л анализируемого раствора. Предел надежного определения нитратов в анализируемой пробе 30 мг/кг.

Таблица 15. Содержание нитратов в продовольственном сырье и пищевых продуктах

Продукты	Содержание нитратов, мг/кг продукта	Продукты	Содержание нитратов, мг/кг продукта
Овощи:		консервы овощемясные	47-320
свекла	39-7771	Соки консервированные:	
репа	82-5429	плодово-ягодные	0-56
редис	41-4527	плодово-овощные	29-64
редька	98-2731	овощные	10-108
капуста свежая:		Фрукты и ягоды:	
ранняя	509-1010	яблоки	2,7-5,5
поздняя	14-3467	груши	1,5-6,5
картофель	4-1218	слива	2,5-3,1
морковь	15-900	хурма	2,9-4,3
огурцы:		облепиха	1,9-2,5
закрытый грунт	67-765	клюква	2,5-3,3
открытый грунт	48-258	черника	2,6-4,00
кабачки	291-672	брусника	3,1-4,3
перец сладкий	10-517	рябина черноплодная	2,6-3,00
томаты	3-365	Молочные продукты:	
баклажаны	42-284	молоко пастеризованное	1,1-14
капуста квашеная	46-320	кисло-молочные продукты	0,5-6,0
огурцы соленые	83-120	творожные изделия	1,5-6,5
лук репчатый	0-150	молоко сухое, цельное	1,0-35
укроп	30-4074	сыры	1,5-2,0
петрушка	388-2022	Мясные продукты:	
лук перо	71-1486	говядина свежая	0-4,0
сельдерей	701-968	сосиски	2,5-3,9
шпинат	621-2417	колбаса «докторская»	2,4-5,8
кинза	520-1240	свинина	1,4-5,4
щавель	53-875	мясо куриное	2,1-4,0
дыня	3-120	Рыба свежая:	
арбуз	6-94	речная	3-43
тыква	14-410	морская	14-21
Зерно и продукты из зерна:		Хлеб:	
зерно мягкой пшеницы	1,2-15	свежий	1,9-6,7
зерно твердой пшеницы	1,1-8,4	высушенный	0,9-8,1
мука пшеничная	2,5-19	макароны	1,5-7,7

Реактивы: 1% раствор алюмокалиевых квасцов; 33% раствор перекиси водорода, толуол, серная кислота.

Посуда и приборы: гомогенизатор, мешалка, аналитические весы, пипетка (10 мл), электрод ионоселективный нитратный; хлорсеребряный электрод, термометр, терка, ватный фильтр, беззольный складчатый фильтр, коническая колба (250 мл и 100 мл), делительная воронка, спектрофотометр.

Ход анализа

Ионометрический метод. 10 г измельченного материала взвешивают с точностью до второго десятичного знака, помещают в стакан гомогенизатора или измельчителя, наливают 50 мл 1% раствора алюмокалиевых квасцов и гомогенизируют в течение 1 мин при частоте вращения 6000 мин^{-1} . При отсутствии гомогенизатора пробу с квасцами перемешивают в стакане с помощью мешалки в течение 3-х мин. В полученной суспензии определяют концентрацию нитрат-ионов. Гомогенизацию можно заменить растиранием массы в ступке с прокаленным песком или битым стеклом, или 15- минутным нагреванием суспензии в кипящей водяной бане с последующим охлаждением.

При анализе капусты 10 г измельченного сырья помещают в стакан на 100 мл, наливают 50 мл экстрагирующего раствора, перемешивают с помощью мешалки в течение 3-х мин. Не прекращая перемешивания, добавляют 2-3 капли 33 % раствора перекиси водорода до обесцвечивания раствора. В полученной суспензии измеряют концентрацию нитрат- ионов.

При использовании для анализа сока отбирают пипеткой 10 мл сока, прибавляют 50 мл 1 % раствора алюмокалиевых квасцов, перемешивают и в полученном растворе определяют концентрацию нитрат–ионов.

Измерение концентрации нитрат–ионов проводят непосредственно в логарифмических единицах $pC \text{ NO}_3$ ($pC \text{ NO}_3 = -\log C \text{ NO}_3$) по шкале иономера, предварительно отградуированного по растворам сравнения, или в милливольтках с последующим определением наличия $pC \text{ NO}_3$ по градуировочному графику, построенному по результатам измерения ЭДС электродной пары в растворах сравнения или в единицах концентрации, в соответствии с инструкцией к прибору.

Перед началом работы измеряют показания растворов сравнения в порядке возрастания концентрации, начиная с меньшей: $C(\text{NO}_3) = 0,0001 \text{ моль/дм}^3$.

Перед погружением электродов (ионоселективного нитратного и электрода сравнения – хлорсеребряного) исследуемые суспензии взбалтывают. Показания прибора считывают не ранее чем через 1 мин после прекращения дрейфа показания прибора. Температура испытуемых проб и растворов сравнения должна быть одинаковой.

После каждого измерения электроды ополаскивают дистиллированной водой и промокают фильтровальной бумагой. По полученному значению величины $pC \text{ NO}_3$ определяют содержание нитрат-ионов в миллиграммах на килограмм исследуемого продукта. Оценку качества продукции проводят в

соответствии с допустимыми уровнями содержания нитратов в растительных продуктах. Допустимые отклонения от ПДК при содержании нитратов до 100 мг/кг 20 %, свыше 100 мг/кг 24 %.

Лабораторная работа №15 **Определение ДДТ в молоке и картофеле**

Реактивы: бензол, окись алюминия, янтарная или фталевая кислота сульфит железа (III), уксусная кислота концентрированная, стандартный раствор ДДТ (10 мг/см³ и 100 мкг/см³), дистиллированная вода.

Посуда и приборы: фарфоровая чашка, хроматографическая колонка (окись алюминия и серноокислый натрий), стеклянные пробирки, фильтровальная бумага, глицериновая баня, ступка с пестиком, нефелометр.

Ход анализа

1. Качественный метод определения ДДТ в молоке. 25-50 см³ молока наливают в фарфоровую чашку и медленно выпаривают на воздушной бане досуха. Сухой остаток в течение 5-10 мин двукратно экстрагируют 1-15 см³ бензола и хроматографируют через слой окиси алюминия. Элюат собирают в пробирку и бензол отгоняют. К сухому остатку добавляют 0,2-0,5 г янтарной или фталевой кислоты. Отверстие пробирки накрывают кружком фильтровальной бумаги, содержащей ферроцианид серебра и смоченной 0,1 % раствором сульфита железа (III). Пробирку погружают в глицериновую баню, нагретую до 200°C, и доводят температуру до 230°C. Появление синего пятна указывает на наличие ДДТ. Чувствительность метода 20 мг в анализируемом объеме.

2. Количественный метод определения ДДТ в молоке. Количественное определение ДДТ основано на образовании эмульсии при прибавлении воды к уксуснокислому раствору ДДТ. По интенсивности образовавшейся эмульсии судят о количестве ДДТ в исследуемом образце.

25-50 см³ молока помещают в фарфоровую чашку и выпаривают досуха на воздушной бане. Сухой остаток экстрагируют двукратно 10-15 см³ бензола. Раствор пропускают через хроматографическую колонку, заполненную окисью алюминия и безводным серноокислым натрием. Бензол отгоняют. Сухой остаток растворяют в 5-10 см³ концентрированной уксусной кислоты и для анализа берут 3 см³.

Одновременно готовят стандартную шкалу, для чего в ряд колориметрических пробирок помещают стандартный раствор (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 см³), содержащий в 1 см³ 10 мг ДДТ. Объем жидкости в пробирках доводят до 3 см³ концентрированной уксусной кислотой и тщательно перемешивают.

Затем вводят во все пробирки (для построения шкалы и с анализируемыми пробами) по 9 см³ воды и снова все тщательно перемешивают. Через 5 мин приступают к нефелометрированию.

3. Количественный метод определения ДДТ в картофеле (в кожуре и мякоти). Снимают слой кожуры толщиной в 1-2 мм с 200 г анализируемого картофеля. Кожуру и мякоть отдельно тщательно растирают в ступке и экстрагируют бензолом в течение 18-20 часов. Полученный экстракт хроматографируют через колонку, заполненную окисью алюминия и сернокислым натрием. Бесцветный прозрачный фильтрат переносят в аппарат для отгонки, который помещают на кипящую водяную баню, и отгоняют растворитель досуха. К сухому остатку прибавляют 10-15 см³ подогретой до 50–60°C концентрированной уксусной кислоты и тщательно перемешивают. Для анализа берут 3 см³.

Стандартную шкалу готовят из химически чистого ДДТ с содержанием 100 мкг/см³. В пробирки с анализируемыми пробами и для построения шкалы добавляют по 9 см³ воды, содержимое пробирок тщательно перемешивают и нефелометрируют.

Чувствительность метода 20 мг в анализируемом объеме.

Оценка результатов. По полученным данным строят калибровочный график. По оси абсцисс откладывают концентрацию ДДТ в микрограммах на кубический сантиметр, по оси ординат – показания шкалы нефелометра. По калибровочному графику находят концентрацию ДДТ в исследуемом растворе. При расчете учитывают все разбавления растворов.

Лабораторная работа № 16

Определение содержания фосфорорганических пестицидов

Реактивы: 1 % раствор уксуснокислого свинца, 1 % раствор азотнокислого серебра, 10 % раствор едкого натрия, раствор молибдата аммония (свежеприготовленный), азотная кислота, серная кислота, исследуемый растительный материал.

Посуда и приборы: плитка, водяная баня, пробирки, воронки.

Ход работы

Качественная реакция на фосфид цинка: Реакция основана на разложении фосфида цинка кислотой с выделением газообразного фосфорного водорода, восстанавливающего азотнокислое серебро. Бумажка, смоченная азотнокислым серебром, чернеет при появлении блестящего налета металлического серебра. В пробирку на 10-20 см³ помещают 0,5 г исследуемого материала и в нее опускают 2 полоски фильтровальной бумаги, из которых одна смочена 1 % раствором уксуснокислого свинца, другая – 1 % раствором азотнокислого серебра. Бумажки опускают так, чтобы они не касались одна

другой и испытуемого материала. Затем в пробирку наливают 1-2 см³ серной кислоты и закрывают пробкой. Реактивные бумажки зажимают пробкой в горлышке пробирки. При наличии фосфора в исследуемом материале бумажка, смоченная раствором серебра, быстро темнеет, а смоченная раствором свинца – не изменяет цвета.

Качественная реакция на хлорофос: в пробирку помещают небольшое количество исследуемой пробы, прибавляют 5 см³ 10 % раствора едкого натрия и кипятят на водяной бане в течение 2-3 мин. После охлаждения раствор фильтруют и к фильтрату прибавляют 1 см³ свежеприготовленного раствора молибдата аммония и 1 см³ азотной кислоты. При добавлении к хлорофосу раствора щелочи раствор желтеет, а при нагревании выпадает небольшой осадок.

Качественная реакция на метилэтилтиофос: проводится как с хлорофосом, но при добавлении молибдата аммония и азотной кислоты выпадает осадок зеленого цвета, который переходит при нагревании в желтый цвет.

Контрольные вопросы

1. Где и в каком количестве содержатся токсичные элементы?
2. Как определить железо в винах, соках плодово-ягодных спиртованных, коньяках и коньячных продуктах?
3. Как определить ДДТ в продуктах растительного происхождения, молоке и картофеле?
4. Расскажите о функциях воды? Что понимают под общей жесткостью воды? Как определить жесткость воды?

Раздел 4. Фальсификация пищевых продуктов

С точки зрения безопасности продуктов питания значительную опасность могут представлять и некоторые виды фальсификации пищевых продуктов. Как правило, это виды ассортиментной фальсификации, которые могут привести к использованию опасных заменителей. Виды таких фальсификаций разнообразны. Примерами могут служить: фальсификация алкогольных напитков путем частичной или полной замены пищевого этилового спирта техническим спиртом, содержащим вредные примеси; приготовление «искусственных» вин; использование запрещенных пищевых добавок или применение их в повышенных количествах; недостаточное отделение примесей в крупяных продуктах, использование загрязненного растительного сырья, мяса больных животных, испорченных полуфабрикатов и т. д. В каждом конкретном случае требуется специальная гигиеническая оценка, основанная на современной нормативно-методической базе и осуществляемая

государственными органами надзора за качеством и безопасностью пищевых продуктов.

Особый интерес представляют так называемые генетически модифицированные (трансгенные) продукты питания. Сообщения о генетически модифицированных растениях и полученных из них продуктах питания появились в начале 90-х гг. XX в. В настоящее время генетическому изменению подвергается важнейшее растительное сырье, а ведь без использования растительного сырья получают лишь очень немногие продукты.

Успехи в области генной инженерии позволяют получать новые сорта растений (причем в течение 2-3 лет) с заданными свойствами.

За счет встраивания генов, выделенных из одних организмов и несущих определенную генетическую информацию (например, устойчивость к заморозкам, гербицидам, болезням и паразитам, высокая урожайность, неполегаемость и др.) в ДНК других, были получены растения, которые называют трансгенными, т. е. с перемещенными генами.

В США в настоящее время насчитывается более 100 наименований генетически измененных продуктов, а площади в разных странах, на которых произрастают трансгенные растения, составляют по разным оценкам от 10 до 25 млн га. Трансгенные растения выращивают в США, Канаде, Японии, Китае, Бразилии, Аргентине и многих других странах. Европейские государства занимают в этом отношении более жесткую позицию.

К трансгенным продуктам можно отнести генетически измененную сою, устойчивую к гербицидам. Как известно, соя используется для приготовления 30000 пищевых продуктов: супов, детского питания, картофельных чипсов, маргарина, салатных соусов, рыбных консервов и др. Кроме сои, наибольшее распространение получили трансгенные помидоры, кукуруза, рис, картофель, клубника, а также генетически модифицированные дрожжи и ферментные препараты, полученные из трансгенных микроорганизмов. Генная инженерия находит применение и в животноводстве, влияя на рост и продуктивность сельскохозяйственных животных.

Безопасность генетически модифицированных продуктов питания остается все еще под вопросом. Нет и не может быть однозначного ответа на вопрос о возможной опасности отдаленных последствий таких продуктов. Очевидно одно – трансгенная продукция должна проходить тщательную многофакторную проверку на безопасность и иметь специальную маркировку. Однако и в этом пока больше вопросов, чем ответов.

Все большее число стран старается регламентировать продажу «новых» пищевых продуктов. Так, в законе, принятом Европарламентом, на упаковках нерафинированного масла и попкорна из генетически измененной кукурузы должна быть соответствующая маркировка, а на упаковке с крахмалом или полученным из него глюкозным сиропом подобной маркировки не требуется. Маркировка не требуется и на упаковке с рафинированным маслом или изготовленным из него майонезом.

Полученные из генетически измененного яблока мусс или яблочный сок должны нести соответствующую маркировку, а яблочный уксус – нет.

Не фиксируется факт использования генетически измененного сырья при изготовлении лецитина и получении с его помощью шоколада и крема. Должны иметь соответствующую маркировку соевый шрот, белок, полученный из него, и готовые супы с данным белком. Корма для животных, полученные из шрота генетически измененной сои, не маркируются.

Таким образом, в странах Евросоюза в настоящее время барьер перед генетически измененной пищей сломан, однако к потребителю допускается пища, в которой обнаруживаются только следы генетических изменений.

В России с 1 июля 1999 г. вступило в силу постановление Министерства здравоохранения РФ «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников». Согласно этому документу, гигиеническая экспертиза пищевых продуктов и продовольственного сырья, а также компонентов (фрагментов) для их производства, полученных из генетически модифицированных источников, должна включать определение вносимой последовательности генов, маркерных генов антибиотиков, промотеров, стабильности генетически модифицированных организмов на протяжении нескольких поколений, а также санитарно-химические показатели качества и безопасности, результаты токсикологических исследований на лабораторных животных, оценку аллергенных свойств продукта, возможных мутагенных, канцерогенных и тератогенных эффектов. Кроме этого, обязательна технологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированного сырья – органолептических свойств и физико-химических показателей.

В широком смысле фальсификация может рассматриваться как действия, направленные на ухудшение потребительских свойств товара или уменьшение его количества при сохранении наиболее характерных, но несуществующих для его использования по назначению свойств. Фальсификация пищевых продуктов чаще всего производится путем придания им отдельных наиболее типичных признаков, например, внешнего вида при общем ухудшении или утрате остальных наиболее значимых свойств, пищевой ценности, в том числе и безопасности.

Заменители и дефектные товары не относятся к фальсифицированным, если на маркировке или в товарно-сопроводительных документах указано их подлинное наименование, а цена соответствует их качеству и происхождению (например, кофейные напитки с таким наименованием не являются фальсификатами).

При фальсификации обычно подвергается подделке одна или несколько характеристик товара, что позволяет выделить несколько видов фальсификации:

- ассортиментная (видовая);
- качественная;
- количественная;
- стоимостная;
- информационная.

Для каждого вида фальсификации характерны свои способы подделки товара.

При *ассортиментной фальсификации* подделка осуществляется путем полной или частичной замены товара его заменителем другого вида или наименования с сохранением сходства одного или нескольких признаков. Признаки, характерные для отдельных разновидностей ассортиментной классификации, представлены на рис. 6.

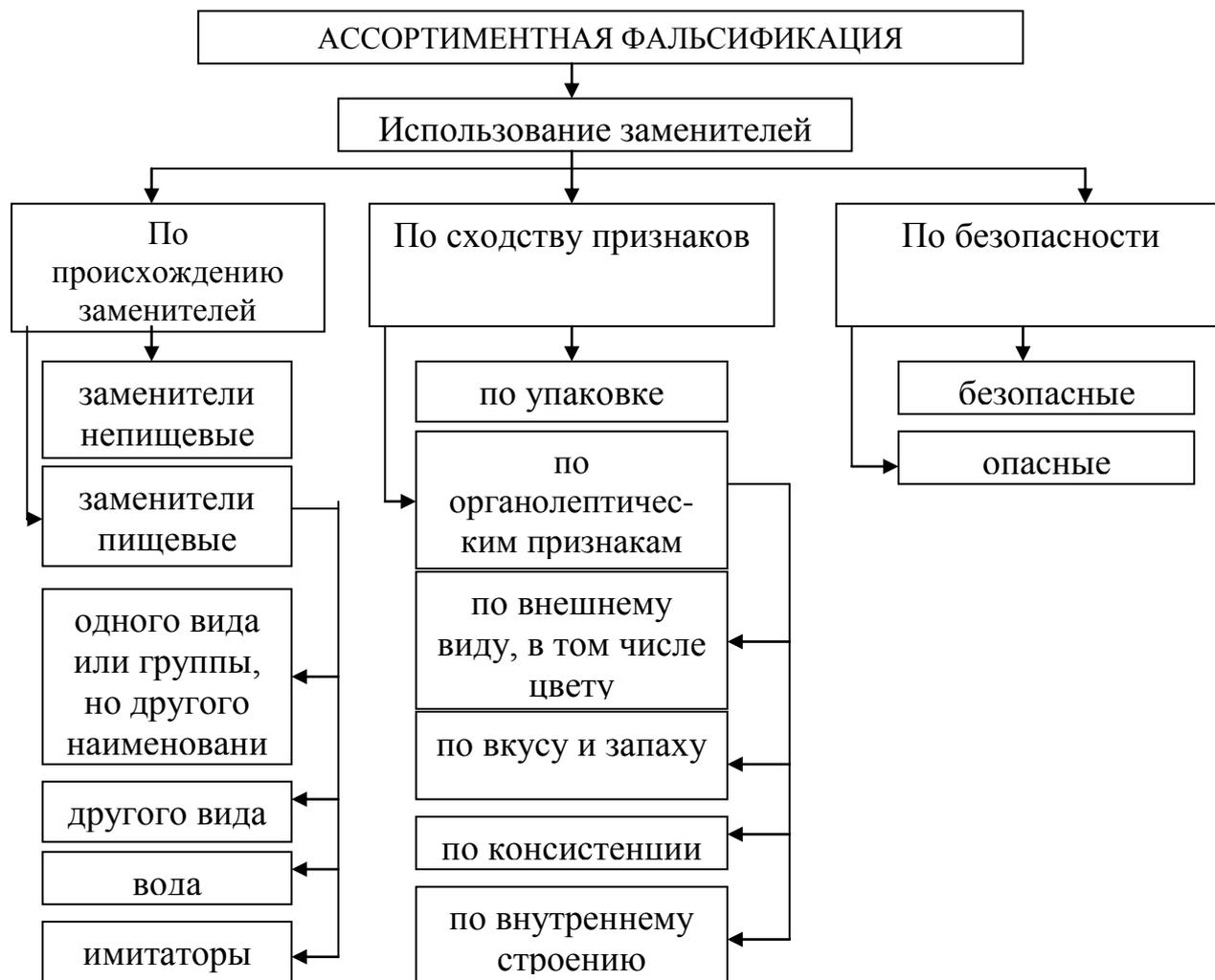


Рис. 6. Признаки и разновидности ассортиментной фальсификации

Для заменителей характерны определенные особенности: значительная дешевизна по сравнению с натуральным товаром, пониженные потребительские свойства, идентичность (сходство) наиболее характерных признаков (внешнего вида, цвета, вкуса и запаха, консистенции). В зависимости от средств фальсификации, схожести свойств заменителя и фальсифицируемого продукта различают следующие способы фальсификации:

- частичная замена продукта водой;
- добавление в продукт низкоценного заменителя, имитирующего натуральный продукт;
- замена натурального продукта имитатором.

Все заменители, применяемые при ассортиментной фальсификации, подразделяют на две группы: пищевые и непищевые.

Пищевые заменители – более дешевые продукты питания, отличающиеся пониженной пищевой ценностью и сходством с натуральным продуктом по одному или нескольким признакам.

В качестве средств ассортиментной фальсификации наиболее часто используют следующие пищевые заменители:

- воду – для жидких продуктов;
- другие имитаторы натурального продукта, схожие по определенным, наиболее характерным признакам.

Степень безопасности фальсифицируемого продукта зависит от качества используемой воды. При использовании недоброкачественной воды, например по микробиологическим показателям, даже разбавленный продукт может стать опасным.

К пищевым заменителям, используемым для целей фальсификации, относятся также различные *имитаторы*, т. е. продукты, применяемые или специально разработанные для замены натуральных продовольственных товаров. Примером могут служить концентраты, сиропы, соки и напитки с использованием синтетических красителей, кислот, ароматизаторов.

При ассортиментной фальсификации происходит частичная или полная замена натурального продукта его заменителем.

Возможна также частичная или полная замена высокоценных товаров другим менее ценным товаром, относящимся к другой или той же однородной группе, но иного вида. Так, довольно часто картофельный крахмал фальсифицируется пшеничной мукой или кукурузным крахмалом.

Непищевые заменители относятся к объектам органического или минерального происхождения и непригодны для пищевых целей. Многие из них могут нанести вред здоровью человека, а иногда привести и к смертельному исходу.

В качестве непищевых заменителей чаще всего применяют мел, гипс, известь, золу для примеси к муке, крахмалу.

Качественная фальсификация – подделка товаров с помощью пищевых и непищевых добавок для улучшения органолептических свойств при сохранении или утрате других потребительских свойств или замена товара высшей градации качества низшей.

Средствами этого вида фальсификации служат добавки и товары того же наименования, что и товар, указанный на маркировке, в сопроводительных документах, но низшей градации.

Способы качественной фальсификации:

- использование добавок, имитирующих улучшение качества;
- пересортица.

Эти способы и средства качественной фальсификации показаны на рис. 7.

В зависимости от степени вреда, наносимого фальсифицированным продуктом, различают две разновидности качественной фальсификации:

- безопасная для жизни и здоровья потребителя;
- опасная.

При безопасной фальсификации потребителю наносится материальный и моральный ущерб, а при опасной, кроме того, вред жизни и здоровью.

К качественной фальсификации следует отнести и пересортицу товаров. Это одна из наиболее широко распространенных разновидностей качественной фальсификации.

Пересортица – действия, направленные на обман получателя и/или потребителя путем замены товаров высших сортов низшими.

Так, вареная колбаса Отдельная 1- го сорта может быть реализована как Любительская, относящаяся к высшему сорту.

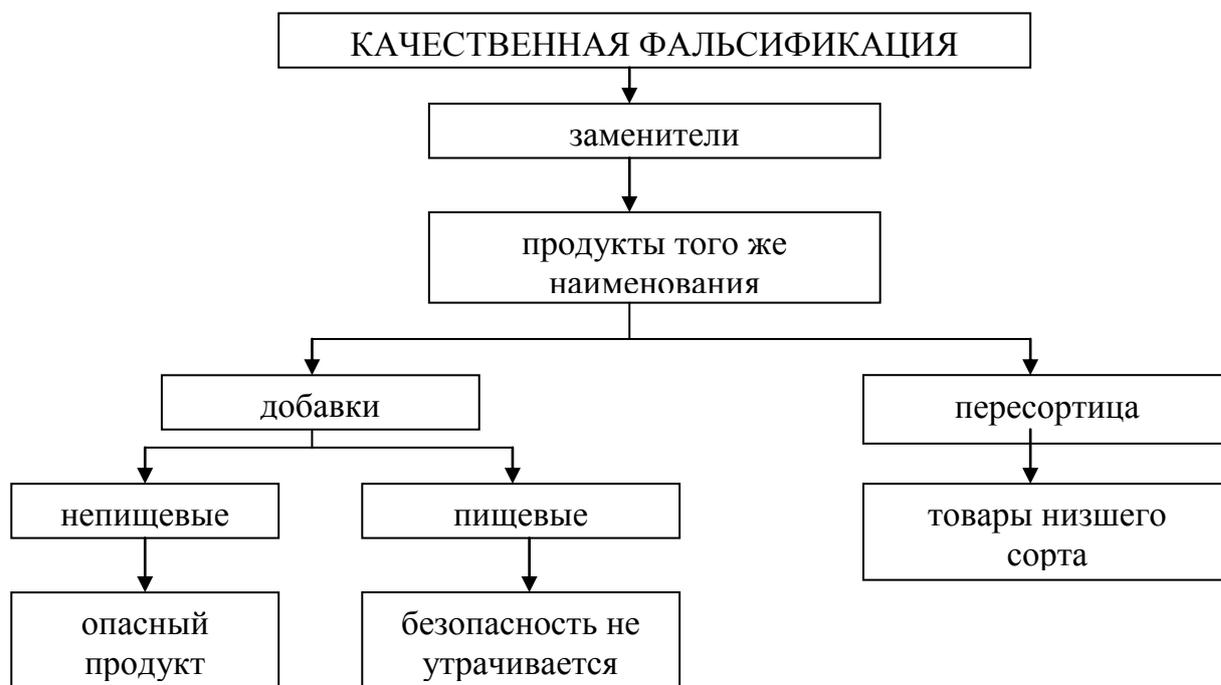


Рис. 7. Способы и средства качественной фальсификации

Количественная фальсификация – это обман потребителя за счет значительных отклонений параметров товара (массы, объема, длины и т.п.), превышающих предельно допустимые нормы отклонений.

В практике этот вид фальсификации называют недвесом или обмером. Способы и средства этой фальсификации основаны на неточных измерениях с грубыми погрешностями всегда в сторону уменьшения размеров измеряемого объекта (рис. 8).

Для количественной фальсификации чаще всего используют фальшивые средства измерений (гири, метры, измерительную посуду) или неточные измерительные технические устройства (весы, приборы и т.п.).



Рис. 8. Средства и способы количественной фальсификации

Стоимостная фальсификация – обман потребителя путем реализации низкокачественных товаров по ценам высококачественных товаров или товаров меньших размерных характеристик по цене товаров больших размеров.

Этот вид фальсификации – самый распространенный, так как совмещается со всеми другими видами фальсификации.

Существует несколько разновидностей стоимостной фальсификации при реализации:

- фальсифицированных товаров по ценам, аналогичным или лидирующим для натурального продукта;
- фальсифицированных товаров по пониженным ценам по сравнению с натуральным аналогом;
- фальсифицированных товаров по ценам, превышающим цены на натуральные аналоги.

Информационная фальсификация – обман потребителя с помощью неточной или искаженной информации о товаре.

Этот вид фальсификации осуществляется путем искажения информации в товарно-сопроводительных документах, маркировке и рекламе. Любой вид фальсификации, рассмотренный ранее, в большинстве случаев дополняется фальсификацией информации о товаре. В противном случае фальсификация легко выявляется.

Искаженная или неточная информация о товаре служит основанием считать заменитель натурального продукта фальсифицированным товаром. Так, к фальсифицированному товару относится маргарин, на маркировке которого и в товарно-сопроводительных документах указывается наименование «сливочное масло». Правильное указание на маркировке наименования продукта – «маргарин» – снимает обвинения в фальсификации.

Наряду с этой классификацией видов и способов фальсификации, можно выявить еще две группы способов фальсификации в зависимости от места ее осуществления:

- технологическая;
- предреализационная.

Технологическая фальсификация – подделка товаров в процессе технологического цикла производства.

Примером может служить использование технического спирта при приготовлении водок, вин, ликероналивочных изделий.

Предреализационная фальсификация – подделка товаров при подготовке их к продаже или при отпуске потребителю.

Это, например, реализация маргарина, выдаваемого за сливочное масло, замена этикеток на низкоценных консервах этикетками с наименованием высокоценных, отпуск мяса низших категорий и сортов по цене и с указанием более высоких градаций.

Лабораторная работа №17 **Способы фальсификации алкогольной продукции** **и методы ее обнаружения**

Винодельческая продукция представляет собой наиболее сложную для идентификации группу алкогольных напитков. Практически все способы фальсификации виноградных вин предполагают доведение стандартных физико-химических характеристик до установленных норм. Кроме того, существуют способы фальсификации, приводящие к улучшению органолептических свойств вина.

Фальсифицированные вина представляют искусственную смесь этилового спирта, сахарозы, органической кислоты, красителя и прочих ингредиентов и могут соответствовать требованиям действующих национальных стандартов и СанПиН 2.3.2.1078-01 по физико-химическим показателям и критериям безопасности. К числу наиболее распространенных способов фальсификации (подделки) винодельческой продукции относятся:

- петиотизация. Вина получают путем настаивания и брожения сахарного сиропа на выжимках (мезге), оставшихся после отделения виноградного сока. Это весьма изощренный способ фальсификации, так как букет и цвет натурального виноградного вина сохраняются (а в некоторых случаях даже улучшаются), снижается лишь содержание винной кислоты и тартратов. Однако известно, что старые, выдержанные вина становятся более "тонкими" за счет осаждения винного камня, и в этом отношении петиотизированное вино по крепости, мягкости и букету весьма похоже на вино старое;

- полная или частичная подмена одного вина другим (более дорогого дешевым с заменой этикетки, контрэтикетки, кольеретки). В результате этого изменяются органолептические показатели, может уменьшиться крепость. Для доведения до требуемых кондиций добавляют синтетические красители ароматизаторы, сахар, спирт-сырец и др.;

- разбавление вина водой, таким путем «исправляют» некачественные кислые вина. Крепость, кислотность и другие показатели доводят до требуемых кондиций, как в первом случае;

- добавление ректифицированного спирта к натуральным винам;

- крепление вин гидролизным спиртом;

- применение при «моделировании» вин альдегидно-эфирной фракции.

Водка относится к наиболее часто фальсифицируемой группе алкогольной продукции. Основными видами фальсификации водок являются ассортиментная и квалитетическая. Ассортиментная фальсификация водок связана с подделкой широко известных и пользующихся высоким спросом брендов. Самыми распространенными средствами и способами квалитетической фальсификации водки являются: полная или частичная замена питьевого спирта на более дешевый – технический спирт; применение воды, не отвечающей требованиям технологии; разбавление или полная замена водой.

К специфическим средствам и способам фальсификации относится нарушение предусмотренного рецептурой состава, прежде всего, в отношении вкусовых и ароматических добавок: невложение в продукт отдельных компонентов или их замена на другие. Примером может служить отсутствие предусмотренных рецептурой меда, дорогих антипохмельных добавок, БАД и т.д. Отличительными признаками водок особых являются специфические вкус и аромат, обусловленные внесением вкусовых и ароматических компонентов, и крепость 40-45 %. Добавляемые компоненты не должны ухудшать прозрачность напитка и окрашивать его.

Квалитетическая идентификация водки направлена на установление природы и сорта спирта, из которого она изготовлена, подтверждение соответствия заявленной производителем крепости. Природу спирта определяют по присутствию (отсутствию) характерных токсичных микропримесей в составе водки (ГОСТ 32039-2013 Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности), а сорт спирта устанавливают путем измерения щелочности, массовых

концентраций альдегидов, сивушного масла, сложных эфиров, объемной доли метилового спирта, так как значения этих физико-химических показателей дифференцированы по сортам спирта.

Реактивы: 0,1 М раствор соляной кислоты, 1 % спиртовой раствор фенолфталеина, 0,1 % раствор щелочи или соды, бензол, анилин, концентрированная соляная кислота.

Посуда и приборы: перегонный аппарат, секундомер (часы), термометр, ареометр для водки, конические колбы и стаканы вместимостью 50, 100 и 200 мл, мерные колбы вместимостью 100 и 250 мл, цилиндр для измерения крепости, пипетки на 25 и 50 мл, бюретка, стеклянная палочка с резиновым наконечником.

Ход анализа

1. Обнаружить фальсификацию вин и напитков синтетическими красителями можно добавив к 10 мл идентифицируемого вина 0,1 % раствор щелочи или соды. Стабильность окраски свидетельствует о наличии синтетических красителей. Изменение окраски природных пигментов следующее:

- красный без нагревания на темно-синюю (грязного оттенка);
- зеленый при нагревании на зелено-бурую;
- желтый и оранжевый при нагревании обесцвечиваются.

2. Существуют простые и доступные экспресс-методы качественного обнаружения токсичных соединений. Оценить запах и аромат спирта можно также путем растирания между ладонями небольших количеств спирта и вдыхания его паров, улетающих в результате нагревания при растирании. Это определение проводится с момента взятия пробы спирта на ладонь до полного его испарения, для того чтобы уловить первые, легко улетающие фракции (эфиры), промежуточные и последние, (например, сивушное масло). Если объемная доля сивушных масел, содержащихся в водке, превышает 0,1 % (1 г/л), то при растирании ее между ладонями появляется специфический запах. Чистая водка такого запаха не имеет.

3. Определение сивушного масла можно провести по методу Готфруа: 10-15 мл водки наливают в термостойкий стакан, добавляют 2-3 капли концентрированной серной кислоты и столько же бензола. Смесь перемешивают, осторожно нагревают и медленно охлаждают.

При наличии сивушного масла раствор приобретает темно-бурый цвет с зеленоватым оттенком.

4. Наличие фурфурола определяют следующим образом: наливают в стакан 20 мл водки, добавляют 3 капли концентрированной соляной кислоты, перемешивают, добавляют 10 капель бесцветного анилина. Если фурфурол присутствует, то проба окрашивается в ярко-красный цвет, напоминающий малиновый сироп.

5. Определение метанола. Порошок борной кислоты, смоченный анализируемой пробой водки, помещают в пламя горелки. Летучие метилбораты окрашивают пламя в зеленый цвет (этилбораты окрашивают в зеленый цвет только кайму пламени).

6. Определение щелочности водок. Метод основан на установлении объема соляной кислоты HCl $0,1$ моль/ дм^3 , израсходованной на титрование 100 см^3 водки. В коническую колбу вместимостью 250 см^3 вносят 100 см^3 анализируемой водки и титруют ее в присутствии двух капель индикатора метилового красного раствором соляной кислоты $0,1$ моль/ дм^3 до перехода желтой окраски в розовую устойчивую. За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных измерений, расхождение между которыми не должно превышать $0,1 \text{ см}^3$.

Полученные результаты внести в табл. 16, оформить выводы по работе.

Таблица 16. Идентификационные показатели образца водки

Наименование образца	Качественные показатели		Количественные показатели	
	Прозрачность и наличие посторонних запахов	Наличие сивушных масел	Объемная доля этилового спирта	Щелочность

Контрольные вопросы

1. Что такое фальсификация? Какие виды фальсификации вам известны? Какие методы определения фальсификации существуют?
2. Назовите средства качественной фальсификации?
3. В чем заключается газохроматографический метод определения подлинности алкогольной продукции?

Раздел 5. Механизм детоксикации ксенобиотиков

Под детоксикацией подразумевается такой процесс, при котором токсические чужеродные вещества, в частности, химические соединения, поступившие в организм, подвергаются значительным изменениям, вследствие чего токсичность исходных веществ уменьшается. Однако известны случаи, когда в результате превращений чужеродных веществ в организме образуются более токсичные соединения, чем исходные.

Для детоксикации ксенобиотиков (чужеродные для организмов химические вещества) большое значение имеют:

- скорость всасывания;

- характер распределения по органам и тканям;
- длительность пребывания в организме;
- метаболические превращения и пути выведения;
- физико-химические свойства и реакционная способность самого вещества и его метаболитов.

Изучение метаболизма чужеродных соединений, превращений, которые они претерпевают, попадая в организм человека, важно, в первую очередь, с точки зрения выяснения химических и биохимических механизмов детоксикации, а также с точки зрения оценки возможностей защитной системы организма по детоксикации чужеродных веществ.

Метаболизм чужеродных соединений в организме будет зависеть от множества различных факторов. Путь ксенобиотика, его воздействие и ответную реакцию организма можно представить в виде следующей схемы (рис.9):

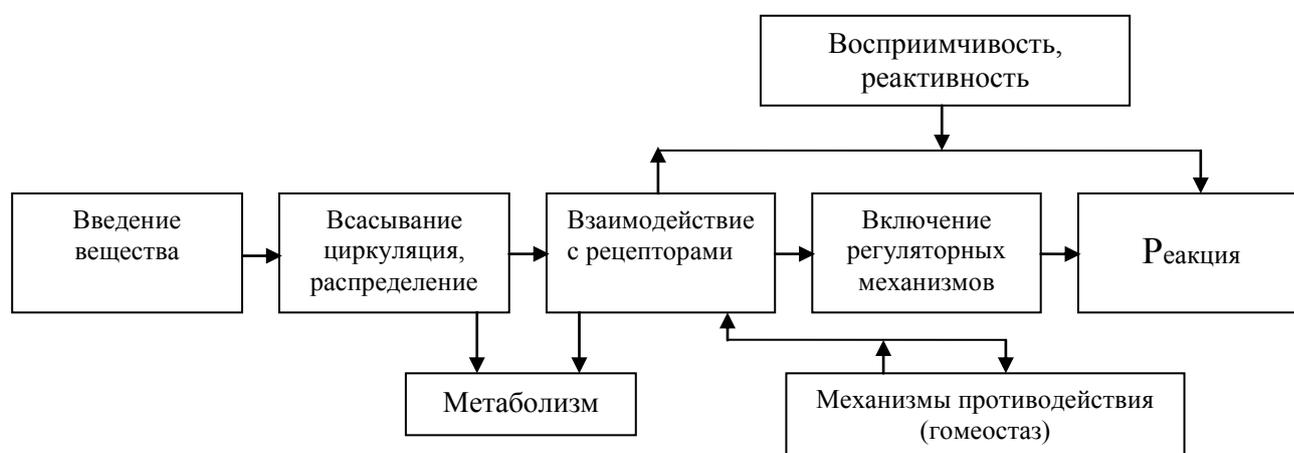


Рис.9. Пути попадания ксенобиотика в организм и ответная реакция

Попадая в организм, определенная доза вещества всасывается в месте контакта, разносится и распределяется в крови и органах. Вследствие метаболических изменений и ритмического протекания процессов детоксикации уровень содержания ксенобиотика падает. В тканях и клетках ксенобиотик проходит через одну или несколько мембран, взаимодействуя с рецепторами. В результате возникает ответная реакция, включаются механизмы противодействия с целью поддержания постоянства внутренней среды – гомеостаза.

Метаболизм ксенобиотиков протекает в виде двухфазного процесса:

- 1-я фаза – метаболические превращения;
- 2-я фаза – реакции конъюгации.

1-я фаза – метаболические превращения – связана с реакциями окисления, восстановления, гидролиза и протекает при участии ферментов главным образом в эндоплазматическом ретикулуме печени и реже – других органов (надпочечников, почек, кишечника, легких, крови и т. д.).

Окисление. В осуществлении реакций окисления решающее значение имеют микросомальные ферменты печени. Окислительная система состоит из системы цитохрома Р-450, который представляет собой гемопротейн с молекулярной массой 45 кДа, а также НАДФН- и НАДН-зависимых редуктаз.

Система цитохрома Р-450 представляет электрон-транспортную цепь, организованную в белково-липидный комплекс, катализирующий окислительно-восстановительную реакцию включения атома кислорода в молекулу гидрофобных соединений R—H. Эта реакция протекает с использованием электронов, поступающих от доноров НАДФН и НАДН к цитохромам Р-450 и b₅ при участии редуктаз (рис.10).

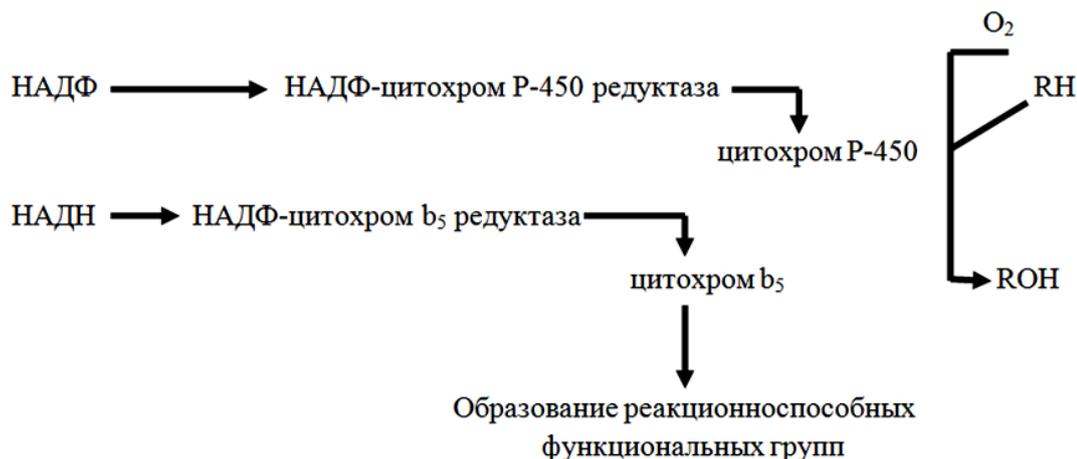


Рис. 10. Схема окислительно-восстановительной реакции при участии цитохрома Р-450 и b₅

Микросомальные ферменты катализируют окисление не только жирных кислот, гидроксирование стероидов, окисление терпенов и алкалоидов, но и окисление различных лекарств, пестицидов, канцерогенных ПАУ и других ксенобиотиков.

Такое многообразие субстратов, на которое воздействует цитохром Р-450, является следствием множественных форм фермента, число которых достигает сотни. В ответ на воздействие различных ксенобиотиков в печени и других органах происходит индукция синтеза тех изоформ цитохрома Р-450, которые метаболизируют данные токсиканты, что эквивалентно реакции иммунной системы организма на воздействие чужеродных белков. Поэтому весь спектр этих ферментов обозначают как генное суперсемейство цитохрома Р-450, для которого была предложена специальная номенклатура. Например, цитохромы Р-450 1A1 и 1A2 метаболизируют полиароматические углеводороды (1-я арабская цифра обозначает генное семейство, латинская буква – генное подсемейство, 2-я цифра – конкретный фермент); цитохром Р-450 3A4 – афлатоксин В, цитохром Р-450 2E1 метаболизирует нитрозоамины и т. п.

Восстановление. Реакции восстановления ксенобиотиков протекают в эндоплазматическом ретикулуме при участии НАДФН-зависимого флавопротеида и цитохрома Р-450. Чаще всего имеют место реакции

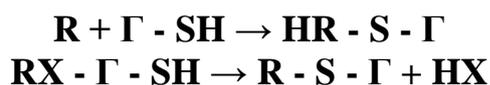
восстановления нитро- и азосоединений в амины, восстановление кетонов во вторичные спирты.

Гидролиз. Речь идет главным образом о гидролизе сложных эфиров и амидов, с последующей деэтерификацией и дезаминированием. Например, при гидролизе фосфоорганических соединений при действии эстераз токсический эффект повышается.

В молекуле ксенобиотика при биотрансформации происходят изменения (увеличение полярности, растворимости и др.), что способствует более быстрому выведению из организма и уменьшению или исчезновению токсического эффекта. Но в ряде случаев в результате первой фазы метаболических превращений образуются промежуточные продукты с большей токсичностью по сравнению с первоначальным ксенобиотиком. Такие реакции получили название *реакций биоактивации*.

2-я фаза – реакции конъюгации – это реакции, приводящие к детоксикации. Наиболее важные из них – это реакции связывания метаболита первичного ксенобиотика и активных –ОН; –NH₂; –COOH и SH-групп. Интересно, что некоторые ксенобиотики, в частности лекарственные средства, могут стимулировать активность ферментов, участвующих в метаболизме различных веществ (не только собственном). Такая ферментативная индукция может считаться выгодной, так как метаболизм и выведение токсических веществ ускоряются, если только промежуточные метаболиты не окажутся более токсичными, чем исходные вещества.

Наиболее широка и многообразна активность ферментов семейства глутатионтрансфераз. Они участвуют в реакциях конъюгации с восстановленным глутатионом, которые могут протекать по следующей схеме:



Кроме того, глутатионтрансферазы восстанавливают органические гидроперекиси в спирты. Уридиндифосфат (УДФ) – глюкуронилтрансферазы присоединяют остаток глюкуроновой кислоты к фенолам, спиртам, аминам. Эти ферменты метаболизируют, например, анилин, фенол, морфин, левомецетин, парацетамол и др. Ацетилтрансферазы присоединяют ацетил к N- или O- атомам, а метилтрансферазы метилируют ОН-, NH₂- и SH- группы различных ксенобиотиков и лекарственных средств. К ферментам второй фазы относятся и некоторые другие ферменты, такие как сульфотрансфераза и метилтрансфераза.

В целом взаимосвязь биотрансформации чужеродных веществ можно представить в виде схемы (рис. 11).

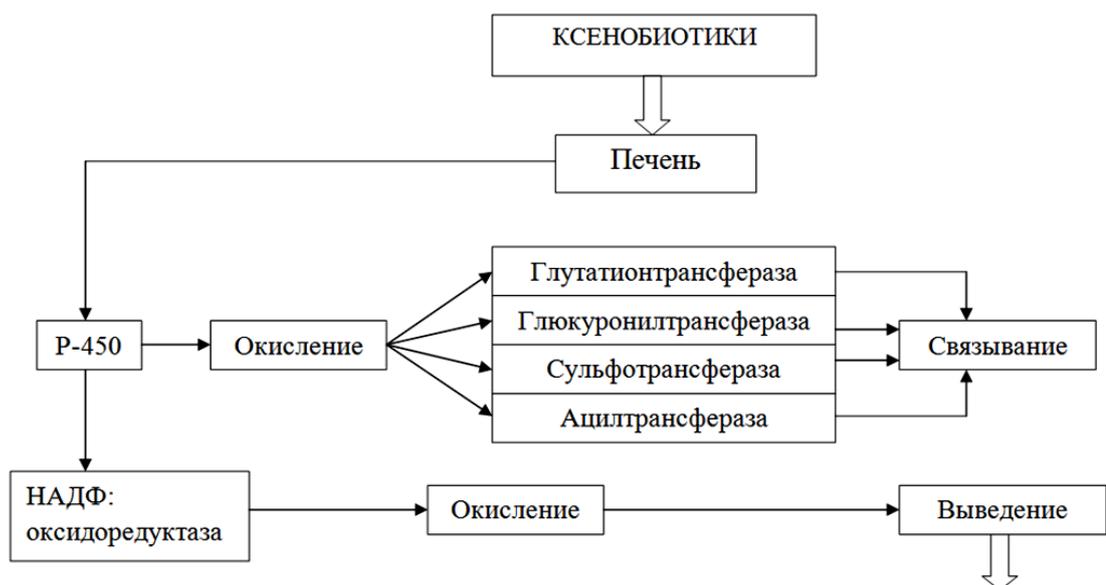


Рис. 11. Схема биотрансформации ксенобиотиков

Функционирование всех ферментов второй фазы ограничивается тем, что они метаболизируют только те вещества, которые имеют функциональные группы, в связи с чем эти ферменты включаются после высвобождения или образования функциональных групп ферментами первой фазы метаболизма ксенобиотиков. Однако трансферазы имеют и важные достоинства: они присутствуют во всех клетках; функционируют при любых путях поступления ксенобиотиков в организм; завершают детоксикацию, а иногда исправляют ошибки первой фазы.

Факторы, влияющие на метаболизм ксенобиотиков

Чужеродные соединения обычно метаболизируются различными путями, образуя множество метаболитов. Скорость и направление этих реакций зависят от многих факторов, результатом действия которых могут быть изменения в картине метаболизма и, как следствие, различия в токсичности.

Эти факторы по своему происхождению можно разделить на генетические (генетически обусловленные дефекты ферментов, участвующих в метаболизме чужеродных соединений); физиологические (возраст, пол, состояние питания, наличие различных заболеваний); факторы окружающей среды (облучение ионизирующей радиацией, стресс из-за неблагоприятных условий, наличие других ксенобиотиков).

Очень важно для процессов детоксикации, чтобы обе ее фазы функционировали согласованно, с некоторым доминированием реакций конъюгации, особенно, если на первой стадии в результате метаболических превращений из первоначальных ксенобиотиков образуются вещества с выраженной токсичностью.

Принципиально важное значение для нормального функционирования обеих фаз детоксикации имеет и соответствующий уровень эффективности антиоксидантной системы клетки, что определяется активностью

антиоксидазных ферментов и уровнем низкомолекулярных антиоксидантов: токоферолов, биофлавоноидов, витамина С и других; поскольку хорошо известно, что функционирование системы цитохрома Р-450 связано с образованием активных форм кислорода: оксид-радикала, H_2O_2 , которые вызывают деструкцию мембран, в том числе мембран эндоплазматического ретикулума, и тем самым способны подавлять активность цитохром Р-450-зависимых ферментов и частично ферментов конъюгации, которые встроены в мембраны и активность которых связана с мембранным окружением.

Таким образом, антиоксидазная система функционирует как еще одна важная система детоксикации, обеспечивающая защиту организма от агрессивных органических свободных радикалов, перекисных производных, которые так же являются опасными факторами онкогенности, как и экзогенные токсиканты.

Контрольные вопросы

1. Дайте характеристику двум фазам метаболизма ксенобиотиков.
2. Охарактеризуйте путь поступления ксенобиотика, его воздействие и ответную реакцию организма.
3. Какие ферментные системы играют решающую роль на стадии метаболических превращений?
4. Ферменты какого класса проявляют наибольшую активность на второй фазе в реакциях конъюгации?

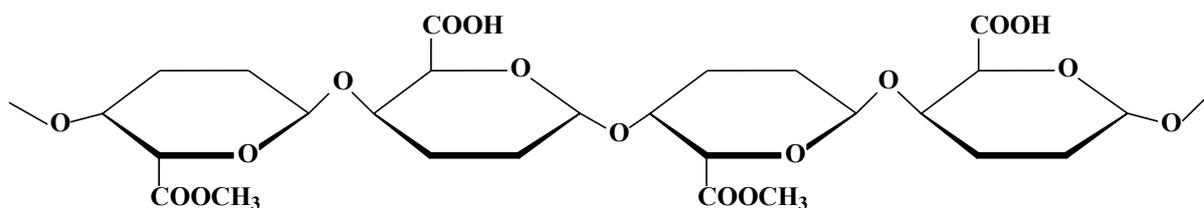
Лабораторная работа №18

Исследование сорбционной способности пектиновых веществ

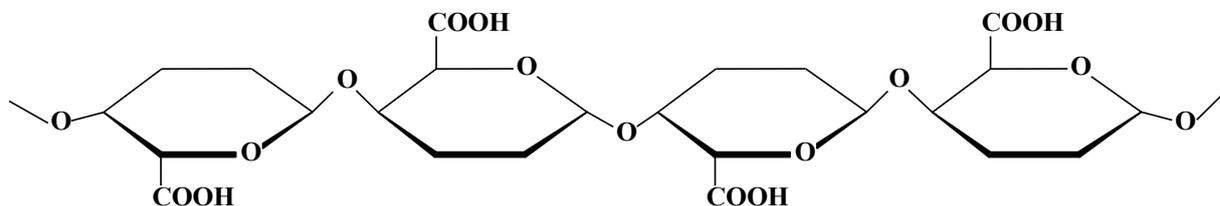
Пектины (pektos (греч.) свернувшийся, замерзший) входят в состав клеточных стенок и межклеточных образований высших растений и через боковые цепочки соединены с гемицеллюлозами, а затем – с волокнами целлюлозы. В такой связанной форме пектины не растворимы в воде и получили название протопектины.

По химической природе пектины представляют собой гетерополисахариды (гетерогликаны) высших растений, основу которых составляют рамногалактуронаны.

Главную цепь молекулы полимера образуют производные полигалактуроновой (пектовой) кислоты, в которой остатки *D*-галактуроновой кислоты связаны 1,4- α -гликозидной связью. В эту цепь неравномерно через 1,2- α -гликозидные связи включены молекулы L-рамнозы. Часть карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты обычно этерифицирована метанолом (пектиновая кислота):



пектиновая кислота



пектовая кислота

Наибольшее количество пектиновых веществ находится в плодах и корнеплодах. Они предохраняют их от высыхания, влияют положительно на засухоустойчивость и обеспечивают тургор. При созревании и хранении плодов нерастворимые формы пектина переходят в растворимые. Растворимые пектиновые вещества содержатся в клеточном соке. Получают пектиновые вещества из яблочных выжимок, свеклы, корзинок подсолнечника, цитрусовых и других отходов переработки растительного сырья.

Номенклатура пектинов основана на степени метоксилирования карбоксильных групп полигалактуроновой цепи. В зависимости от количества метоксильных групп и степени полимеризации различают высокоэтерифицированные (этерифицировано более 50 % карбоксильных групп) и низкоэтерифицированные (этерифицировано менее 50 % карбоксильных групп) пектины.

Высокоэтерифицированные пектины способны образовывать гели в присутствии кислот и сахара при соблюдении определенного соотношения. Низкоэтерифицированные пектины способны образовывать гели лишь в присутствии ионов кальция. На этом основано их использование в качестве студнеобразующего вещества в кондитерской и консервной промышленности для производства мармелада, желе и джемов, а также в хлебопечении, сыроделии.

Важная роль пектина обусловлена его способностью связывать ионы тяжелых металлов, радионуклиды и выводить их из организма.

Комплексообразующая способность пектинов (образование циклических комплексов поливалентных металлов) увеличивается с ростом содержания карбоксильных групп и с увеличением их степени диссоциации (с ростом pH среды) и изменяется в ряду:



С увеличением загрязнения окружающей среды, в том числе и тяжелыми металлами, возрастает значение в питании человека продуктов, богатых пектином (например, овощей и фруктов). Это дает основание рекомендовать

пектин для включения в рацион питания лиц, находящихся в среде, загрязненной радионуклидами, и имеющих контакт с тяжелыми металлами. Профилактическая норма пектина, утвержденная ВОЗ, составляет 2-4 г в сутки; для лиц, работающих в неблагоприятных условиях, 8-9 г в сутки.

Пектины, как растворимые пищевые волокна, являются физиологически ценными веществами, способными снижать уровень холестерина в крови, нормализовывать деятельность ЖКТ, выводить некоторые токсины. Пектиновые вещества важны для профилактики нарушений жирового обмена, атеросклероза, сахарного диабета, желчно-каменной болезни. ПВ влияют на функцию толстого кишечника. Они стимулируют перистальтику кишечника, усиливают выделение желчи, способны адсорбировать продукты обмена микроорганизмов, желчные кислоты.

Избыточное потребление пектиновых веществ может привести к неполному перевариванию пищи, нарушению всасывания в кишечнике кальция, железа, магния, цинка и других микроэлементов, а также жирорастворимых витаминов.

Одним из тяжелых металлов, способных загрязнять пищевые продукты, является медь. Определение концентрации меди можно проводить в форме аммиаката меди фотоколориметрическим методом. При добавлении избытка аммиака к раствору, содержащему сульфат меди, появляется интенсивное синее окрашивание, обусловленное образованием аммиаката меди, с максимумом поглощения при $\lambda = 620$ нм.

Реактивы: 5 % раствор гидроксила аммония; 0,5 % раствор пектина; 0,5 % раствор яичного альбумина; 1 % и 4 % растворы сульфата меди; 1 % раствор картофельного крахмала.

Посуда и приборы: пипетки 5 мл; пробирки; стеклянные воронки; фотоэлектроколориметр с кюветами.

Ход анализа

Построение калибровочной кривой. Из 1 % исходного раствора сульфата меди приготовить растворы с уменьшающейся концентрацией по схеме:

- раствор № 1: 2 мл (исходного раствора, 10 мг/мл);
- раствор № 2: 9 мл (исходного раствора) + 1 мл воды;
- раствор № 3: 8 мл (раствора № 2) + 1 мл воды;
- раствор № 4: 7 мл (раствора № 3) + 1 мл воды;
- раствор № 5: 6 мл (раствора № 4) + 1 мл воды;
- раствор № 6: 5 мл (раствора № 5) + 1 мл воды;
- раствор № 7: 4 мл (раствора № 6) + 1 мл воды;
- раствор № 8: 3 мл (раствора № 7) + 1 мл воды;
- раствор № 9: 2 мл (раствора № 8) + 2 мл воды;
- раствор № 10: 2 мл (раствора № 9) + 2 мл воды.

Содержимое пробирок (1-10) перемешать и провести реакцию образования аммиаката меди. Для этого к 2 мл испытуемых растворов добавить по 1 мл 5 % раствора гидроксила аммония и 2 мл воды, перемешать и измерить интенсивность окрашенных растворов относительно дистиллированной воды на фотоэлектроколориметре при светофильтре с длиной волны 620 нм. Полученные данные внести в табл. 17.

Таблица 17. Данные для построения калибровочного графика

Номер пробирки	Концентрация сульфата меди в растворе, мг/мл	Оптическая плотность
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

По данным табл. 17 построить калибровочный график зависимости оптической плотности исследуемого раствора от концентрации сульфата меди, выраженной в миллиграммах на 1 миллилитр измеряемого раствора.

Исследование способности крахмала связывать ионы меди. В несколько пробирок внести испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 18.

Таблица 18. Схема эксперимента и полученные результаты

Состав раствора, мл			Оптическая плотность	Количество связанной меди, мг
CuSO ₄ (4%)	Крахмал (1 %)	Вода		
1,0	0,0	4,0		
1,0	1,0	3,0		
1,0	2,0	2,0		
1,0	3,0	1,0		
1,0	4,0	0,0		

Содержимое пробирок перемешать, при необходимости отфильтровать. В фильтрате определить концентрацию ионов меди с помощью реакции образования аммиаката меди. Для этого из каждой пробирки отобрать по 2 мл полученных прозрачных растворов и добавить по 1 мл 5 % раствора гидроксила аммония и 2 мл воды.

Содержимое пробирок перемешать и измерить интенсивность окрашенных растворов на фотоэлектроколориметре при светофильтре с длиной волны 620 нм. Остаточную концентрацию меди в исследуемых растворах ($C_{ост}$ мг/мл) найти по калибровочной кривой (рис.12).



Рис. 12. Калибровочная кривая содержания меди (II)

Количество связанной меди C рассчитать по формуле, мг:

$$C = (C_{исх} - C_{ост}),$$

где $C_{исх}$ – исходная концентрация меди в растворе, мг/мл;

$C_{ост}$ – остаточная концентрация меди в растворе, мг/мл.

Полученные данные внести в табл. 18.

Исследование способности пектина связывать ионы меди. В несколько пробирок внести испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 19.

Таблица 19. Схема эксперимента и полученные результаты

Состав раствора, мл			Оптическая плотность	Количество связанной меди, мг
CuSO ₄ (4 %)	Пектин (0,5 %)	Вода		
1,0	0	4,0		
1,0	0,5	3,5		
1,0	1,0	3,0		
1,0	2,0	2,0		
1,0	3,0	1,0		

Содержимое пробирок перемешать. Образовавшийся осадок отделить фильтрованием. В фильтрате определить остаточную концентрацию ионов меди и количество связанной пектином меди по вышеописанной методике. Результаты эксперимента внести в табл. 19.

Исследование способности белка связывать ионы меди. В несколько пробирок внести испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 20.

Таблица 20. Схема эксперимента и полученные результаты

Состав раствора, мл			Оптическая плотность	Количество связанной меди, мг
CuSO ₄ (4 %)	Белок (0,5 %)	Вода		
1,0	0,0	4,0		
1,0	0,5	3,5		
1,0	1,0	3,0		
1,0	2,0	2,0		
1,0	3,0	1,0		

Содержимое пробирок перемешать и отфильтровать. В фильтрате определить остаточную концентрацию ионов меди и рассчитать количество меди, связанной белком, по вышеописанной методике.

Исследование способности смеси белка и пектина связывать ионы меди. В ряд пробирок внести испытуемые растворы в количествах, указанных в табл. 21.

Таблица 21. Схема эксперимента и полученные результаты

Состав раствора, мл				Оптическая плотность	Количество связанной меди, мг
CuSO ₄ (4 %)	Пектин (0,5 %)	Белок (0,5 %)	Вода		
1,0	1,0	0,0	3,0		
1,0	1,0	1,0	2,0		
1,0	1,0	2,0	1,0		
1,0	1,0	3,0	0,0		
1,0	0,0	1,0	3,0		
1,0	2,0	1,0	1,0		
1,0	3,0	1,0	0,0		
1,0	0,0	0,0	4,0		

Содержимое пробирок отфильтровать. В фильтре определить остаточную концентрацию ионов меди и рассчитать количество связанной пектином и белком меди по вышеописанной методике. На основании полученных результатов сделать выводы о способности различных биополимеров связывать ионы меди и сравнить связывающую способность пектина, белка и их смесей.

Раздел 6. Биотестирование в оценке безопасности

Методы физико-химического анализа, несмотря на высокую информативность, не позволяют дать объективную и всестороннюю оценку безопасности исследуемых объектов. Это объясняется увеличением количества ксенобиотиков во внешней среде, что делает невозможным их индикацию при помощи физико-химических методов, которые требуют сложного оборудования и являются дорогостоящими. Кроме того, данные методы не могут дать интегральную токсикологическую оценку, поскольку не учитывают эффекта взаимодействия токсикантов как между собой, так и с компонентами окружающей среды, в результате чего токсические свойства соединений могут ослабляться или усиливаться.

Перспективным и реальным является использование биологических тестов – это оценка реакции тест-организмов на ту или иную субстанцию, которые в совокупности с физико-химическими методами позволяли бы быстро и с высокой степенью достоверности давать заключение о безопасности продуктов животноводства и птицеводства и других объектов ветеринарно-санитарного и экологического контроля.

Биотестовые методы достаточно информативны, отличаются высокой производительностью, не требуют сложного оборудования и больших материальных затрат, безупречны с этической точки зрения. Их использование дает возможность интегральной оценки всех токсических соединений, в том числе комплексных, присутствующих в исследуемом объекте.

Для биотестирования используются различные гидробионты – водоросли, микроорганизмы, беспозвоночные, рыбы. Наиболее популярные объекты – ювенальные формы (juvenile forms) планктонных ракообразных – фильтраторов *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*.

Важное условие правильного проведения биотестирования – использование генетически однородных лабораторных культур, так как они проходят проверки чувствительности, содержатся в специальных, оговоренных стандартами, лабораторных условиях, обеспечивающих необходимую сходимость и воспроизводимость результатов исследований, а также максимальную чувствительность к токсическим веществам. Биотестирование как метод оценки токсичности водной среды используется:

- при проведении токсикологической оценки промышленных, сточных бытовых, сельскохозяйственных, дренажных, загрязненных природных и прочих вод с целью выявления потенциальных источников загрязнения;
 - в контроле аварийных сбросов высокотоксичных сточных вод;
 - при проведении оценки степени токсичности сточных вод на разных стадиях формирования при проектировании локальных очистных сооружений;
 - в контроле токсичности сточных вод, подаваемых на очистные сооружения биологического типа с целью предупреждения проникновения опасных веществ для биоценозов активного ила;

- при определении уровня безопасного разбавления сточных вод для гидробионтов с целью учета результатов биотестирования при корректировке и установлении предельно допустимых сбросов (ПДС) веществ, поступающих в водоемы со сточными водами;

- при проведении экологической экспертизы новых материалов, технологий очистки, проектов очистных сооружений и т. п.

Жизненная функция, или критерий токсичности (toxicity criterion), используемые в биотестировании для характеристики отклика тест-объекта на повреждающее действие среды.

Тест-функции, используемые в качестве показателей биотестирования для различных объектов:

- для инфузорий, ракообразных, эмбриональных стадий моллюсков, рыб, насекомых – выживаемость (смертность) тест-организмов;

- для ракообразных, рыб, моллюсков – плодовитость, появление аномальных отклонений в раннем эмбриональном развитии организма, степень синхронности дробления яйцеклеток;

- для культур одноклеточных водорослей и инфузорий – гибель клеток, изменение (прирост или убыль) численности клеток в культуре, коэффициент деления клеток, средняя скорость роста, суточный прирост культуры;

- для растений – энергия прорастания семян, длина первичного корня и др.

Лабораторная работа № 19 **Биотестирование с использованием ракообразных** ***daphnia magna straus***

Методика основана на определении смертности дафний (*daphnia magna straus*) при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой водной вытяжке, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсических веществ (контроль). Количество живых и мертвых дафний определяется методом прямого счета.

В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливают:

- 1) летальную концентрацию водной вытяжки, вызывающую гибель 50 % и более тест-организмов за 24-часовую экспозицию;

- 2) безвредную концентрацию водной вытяжки, вызывающую гибель 50 % и более тест-организмов за 24-часовую экспозицию.

Реактивы: культивационная вода, исследуемый материал.

Приборы и посуда: климатостат для биотестирования, пипетки мерные вместимостью от 1 до 10 см³, посуда стеклянная: вместимостью 2 дм³ для

культивирования дафний; вместимостью от 100 до 150 см³ для биотестирования, цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм³.

Ход анализа

Подготовка культивационной воды. Культивационная вода используется для культивирования дафний; в качестве контрольной пробы при биотестировании и для разбавления исследуемых вод.

Для подготовки культивационной воды питьевую воду отстаивают в течение 3-7 суток (до полного дехлорирования) в бутылках из бесцветного стекла.

Культивационная вода должна удовлетворять следующим требованиям:

1) отсутствие органических загрязняющих веществ, хлора, токсических веществ, антагонистических для дафний организмов (сине-зеленых водорослей) и пищевых конкурентов (простейших и многоклеточных);

2) рН 7,0-8,5;

3) жесткость общая от 80 до 250 мг/дм³ (выраженная в CaCO₃);

4) температура от + 19 до + 25 °С.

В культивационной воде требуемого качества выживаемость тест-культуры рачков дафний за 24-часовой период биотестирования должна быть не ниже 100 %. При этом гибель 50 % рачков в конце первых суток экспонирования должна наступать при внесении в нее бихромата калия в диапазоне концентраций 0,9-2,0 мг/дм³. Более низкая чувствительность к данному модельному токсиканту может быть вызвана присутствием в культивационной воде повышенного количества примесей, способных вступать с ним во взаимодействие. В результате этого токсикант становится менее доступным для тест-организмов.

Для повышения чувствительности биотеста можно разбавить культивационную воду дистиллированной водой в 1,5-3,0 раза.

Приготовление разбавлений для исследуемых водных вытяжек для биотестирования. Для приготовления разбавлений исследуемых водных вытяжек используется культивационная вода. Предварительно перед приготовлением необходимых разбавлений водных вытяжек для исследования подготавливают соответствующей емкости посуду, в которой будут готовить растворы.

Для приготовления разбавлений берут определенные, отмеренные мерной посудой, объемы исследуемой и разбавляющей (культивационной) воды.

Чем выше предполагаемая токсичность, тем большей должна быть кратность разбавлений исходной пробы, то есть исследуемые концентрации уменьшают и составляют 10; 3; 1,0; 0,3; 0,1 %. В процессе приготовления разбавлений пробы тщательно перемешивают.

При выполнении практического биотестирования используют в основном два показателя, характеризующих содержание исследуемой воды в разбавленном растворе: во сколько раз исследуемая вода разбавлена и каково ее процентное содержание в разбавлении.

Условия проведения методики биотестирования по смертности дафний. Биотестирование проводится в соответствии с методикой биотестирования по гибели ракообразных *daphnia magna straus*, помещение не должно содержать токсичных паров и газов.

Температура окружающего воздуха в лаборатории 7-27°C.

Атмосферное давление 630-800 мм рт. ст.

Освещение помещения может быть естественным или искусственным, и не ограничено особыми требованиями.

Температура в климатостате для биотестирования (20±10)°С.

Оценка результатов: Для определения острой токсичности водной вытяжки, рассчитывается процент погибших в тестируемой воде дафний А по сравнению с контролем, %:

$$A = \frac{X_{\text{контр}} - X_{\text{тест}}}{X_{\text{контр}}} 100,$$

где $X_{\text{контр}}$ – количество выживших дафний в контроле;

$X_{\text{тест}}$ – количество выживших дафний в воде.

При $A \leq 10$ % тестируемая водная вытяжка не оказывает острого токсического действия.

При $A \geq 50$ % тестируемая водная вытяжка оказывает острое токсическое действие.

Результаты измерений острой токсичности водной вытяжки после контакта с исследуемым материалом занести в табл. 22.

Таблица 22 Результаты измерений острой токсичности водной вытяжки после контакта с исследуемым материалом

Процентное содержание исследуемой водной вытяжки при разбавлении, %	Время от начала биотестирования, ч	Количество выживших дафний в		Смертность дафний в опыте, %
		контроле	опыте	
	24			
	24			
	24			

Порядок прохождения лабораторного практикума

Перед началом работы студент сдает теоретические основы лабораторной работы с целью выяснения уровня подготовки к ее выполнению. Заблаговременно (а не в часы лабораторных занятий) составляется план выполнения данной работы по методике эксперимента, представленной в лабораторном практикуме, готовятся формы таблиц для записи наблюдений, и все предьявляется преподавателю перед началом занятий при собеседовании.

После согласования плана студент изучает экспериментальную установку и готовит ее к работе. Подготовленную установку необходимо показать преподавателю. Только после получения допуска студент может приступить к выполнению лабораторной работы.

При выполнении запланированного объема эксперимента нужно записывать все первичные данные в лабораторном журнале. После завершения всех запланированных опытов и анализов желательно провести предварительную обработку результатов и согласовать с преподавателем окончание экспериментальной работы.

После окончания работы следует выключить установку, вымыть посуду и сдать ее дежурному лаборанту.

Правила оформления и представления отчета по лабораторной работе. Конечным этапом лабораторных исследований является составление отчета по выполненной работе. Отчет выполняется в тетради, которая должна иметь титульный лист на лабораторный практикум.

Отчет должен содержать:

- краткое теоретическое введение со ссылкой на литературные источники;
- план (методику выполнения работы);
- схему установки и ее краткое описание;
- первичные результаты эксперимента в виде таблиц и графиков;
- обработку результатов с анализом погрешностей эксперимента,
- необходимые расчеты и обсуждение результатов;
- выводы;
- список использованной литературы.

По окончании работы лабораторный журнал подписывается преподавателем.

Отчет по лабораторной работе, как правило, должен быть представлен на следующем после выполнении данной работы занятии.

Основные правила безопасности при работе в лаборатории

Работа в химической лаборатории требует строгого соблюдения правил по технике безопасности, противопожарной безопасности и гигиене труда. Эти правила необходимо выполнять не только в целях личной безопасности, но и для обеспечения безопасности окружающих.

Каждый студент перед началом занятий должен пройти подробный вводный инструктаж. Следует ознакомиться с рабочим местом, индивидуальными средствами защиты, спецодеждой.

При выполнении лабораторного практикума необходимо представлять себе особенности лабораторных работ, связанные с характером применяемых материалов и оборудования. Перед началом работы студент должен ознакомиться с последовательностью выполнения отдельных разделов задания.

В ходе работы требуется соблюдать ряд основных правил:

- иметь в лаборатории постоянное место работы и работать в халате;
- готовить рабочее место перед началом работы и не загромождать его в процессе работы;
- проверять чистоту и целостность посуды, исправность приборов до начала работы;
- проводить эксперимент в соответствии с инструкцией;
- нельзя пробовать на вкус или неосторожно нюхать какие-либо вещества, пить воду из химической посуды и принимать пищу;
- при нагревании вещества или реакционных смесей разогрев вести осторожно, держать пробирку не рукой, а пользоваться держателем, правильно держать колбу или пробирку (отверстие должно быть направлено от себя и окружающих);
- при переносе горячих колб, стаканов, а также тиглей под дно подкладывают асбестовую подкладку и держат их вдали от себя. Тигли следует поддерживать щипцами. Нагретые колбы не закрывают притертыми пробками, а сначала их охлаждают;
- работу с концентрированными щелочами и кислотами вести аккуратно и под тягой, не сливать их в канализацию без предварительного разведения;
- при попадании кислоты на кожу необходимо быстро промыть пораженный участок большим количеством воды и обработать слабым раствором соды;
- при попадании на кожу щелочи необходимо промыть пораженный участок большим количеством воды и обработать раствором борной или уксусной кислоты;

- в случае пролива кислот или щелочей на пол или рабочее место последнее засыпают песком, нейтрализуют и лишь после этого производят уборку;
- работу с легковоспламеняющимися жидкостями (ЛВЖ) вести под тягой и вдали от нагревательных приборов;
- при загорании спирта, эфира и других ЛВЖ не тушить огонь водой, а воспользоваться песком;
- органические отходы сливают в специальные бутылки с соответствующей этикеткой; по мере их накопления лаборант производит их утилизацию;
- по окончании работы привести рабочее место в порядок, сдать его учебному инженеру и вымыть руки.

Библиографический список

1. Витол, И.С. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания: учебник / И.С. Витол, А.В. Коваленок, А.П. Нечаев. – М.: ДеЛи принт, 2010. – 352 с.
2. Градова, Н.Б. Биологическая безопасность биотехнологических производств: учебное пособие / Н.Б. Градова., Е.С. Бабусенко., В.И. Панфилов – М.: ДеЛи принт, 2010. – 136 с.
3. Пищевая химия / Нечаев А.П. [и др]; под ред. А.П. Нечаева. – Изд. 3-е, испр.-СПб.: ГИОРД, 2004. – 640 с.
4. Закревский, В.В. Безопасность пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище: практическое руководство по санитарно-эпидемиологическому надзору/ В.В. Закревский – СПб.: ГИОРД, 2004. – 280 с.
5. Донченко, Л.В. Безопасность пищевой продукции: учеб. для вузов по специальности 311200 "Технология пр-ва и перераб. сельскохоз. продукции – Изд. 2-е, перераб. и доп. - М.: ДеЛи принт, 2007. – 539 с.
6. Никифорова, Т.Е. Биологическая безопасность продуктов питания: учеб. пособие / Т.Е. Никифорова, ГОУ ВПО «Иван. гос. хим.-технол. ун-т». Иваново, 2009. – 179 с.
7. Позняковский, В.М. Гигиенические основы питания, качество и безопасность пищевых продуктов: учебник / В.М. Позняковский. – 4-е изд., испр. и доп. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2005. – 522 с.
8. Химический состав российских пищевых продуктов: справочник / под ред. И.М. Скурихина. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 236 с.
9. Австриевских, А.Н. Управление качеством на предприятиях пищевой и перерабатывающей промышленности / А.Н. Австриевских – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 272 с.
10. Качество и безопасность продуктов питания/ В.М. Кантаре [и др.] – М.: ИК МГУПП, 2001. – 398 с.
11. ГОСТ Р 53430-2009 Молоко и продукты переработки молока. Методы микробиологического анализа. – Введ. 2011–01–01. – М.: Стандартиформ, 2011. – 28 с.
12. ГОСТ 3623-73 Молоко и молочные продукты. Методы определения пастеризации. – Введ. 1976–01–01. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2003. – 13 с.
13. ГОСТ 7636-85 Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа. – Введ. 1986–01–01. – М.: Стандартиформ, 2010. – 28 с.
14. Правила ветеринарно-санитарной экспертизы растительных пищевых продуктов в лабораториях ветеринарно-санитарной экспертизы рынков, утверждены ГУВ МСХ СССР и согласованы с МЗ СССР 04.10.1980.
15. ГОСТ 23392 – 78 Мясо. Методы химического и микроскопического анализа свежести. – Введ. 1980–01–01. – М.: Стандартиформ, 2006. – 7 с.

16. Гамаюрова, В.С. Пищевая химия. Лабораторный практикум : учеб. пособие / В.С. Гамаюрова, Л.Э. Ржечицкая. – СПб.: Гиорд, 2006. – 136 с.
17. ГОСТ 32114-2013 Продукция алкогольная и сырье для ее производства. Методы определения массовой концентрации титруемых кислот. – Введ. 2014-07-01. – М.: Стандартинформ, 2013. – 8 с.
18. ГОСТ 19885-74 Чай. Методы определения содержания танина и кофеина. – Введ. 1975-07-01. – М.: Стандартинформ, 2009. – 5 с.
19. Айсина, Р.А. Токсикология и токсикологический анализ: методические указания к лабораторным занятиям / Р.А. Айсина, Н.М. Ошакбаева – Кустанай: Костанайский государственный университет им. А. Байтурсынова, 2007. – 89 с.
20. ГОСТ 13195-73 Вина, виноматериалы, коньяки и коньячные спирты. Соки плодово-ягодные спиртованные. Метод определения железа. – Введ. 1975-01-01. – М.: Стандартинформ, 2009. – 8 с.
21. ГОСТ 31954-2012 Вода питьевая. Методы определения жесткости. – Введ. 2014-01-01. – М.: Стандартинформ, 2013. – 16 с.
22. ГОСТ 29270-95 Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения нитратов. – Введ. 1997-01-01. – М.: Стандартинформ, 2010. – 14 с.
23. Сперанский, В.В. Лабораторный практикум по дисциплине Основы токсикологии ОПД.Ф.09. / В.В. Сперанский, Н.Б. Бубеева. Е.В. Мангутова – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2004. – 23 с.
24. Лебедева, С.Н. Пищевая безопасность и методы ее оценки: учебно-практическое пособие. / С.Н. Лебедева, Э.Б. Битуева – Улан-Удэ: Изд-во ВСГУТУ, 2011. – 93 с.
25. ГОСТ 32039-2013 Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения подлинности. – Введ. 2014-07-01. – М.: Стандартинформ, 2014. – 14 с.
26. Голубев, В.Н. Пектин: химия, технология, применение / В.Н. Голубев, Н.П. Шелухина. – М.: Изд. Акад. технолог. наук, 1995. – 387с.
27. ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06 Токсикологические методы анализа. Методика определения острой токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по смертности дафний (*Daphnia magna Straus*).

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Раздел 1. Природные токсиканты.....	5
Лабораторная работа №1. Бактериологическое исследование молока и рыбы.....	7
Лабораторная работа №2. Определение в муке посторонних примесей и спорыньи.....	12
Лабораторная работа №3. Определение свежести мяса.....	17
Раздел 2. Опасные природные компоненты пищи.....	20
2.1. Антиалиментарные факторы питания.....	20
Лабораторная работа №4. Амилолитический ферментный комплекс солода.....	22
Лабораторная работа №5. Ингибиторы амилаз солода.....	28
Лабораторная работа №6. Белковые ингибиторы протеиназ...	30
Лабораторная работа №7. Определение щавелевой кислоты в плодово-ягодных соках и винах.....	33
Лабораторная работа №8. Определение содержания танина в чае.....	36
2.2. Алкалоиды.....	38
Лабораторная работа №9. Определение массовой доли кофеина фотометрическим методом.....	40
Лабораторная работа №10. Экстракционно-фотометрическое определение кофеина в чае.....	43
Лабораторная работа №11. Определение соланина в картофеле.....	44
Раздел 3. Антропогенные токсиканты.....	46
3.1. Токсичные элементы.....	46
Лабораторная работа №12. Определение железа в вине с железистосинеродистым калием.....	48
Лабораторная работа №13. Определение жесткости воды....	52
3.2. Загрязнение веществами, применяемыми в растениеводстве.....	56
Лабораторная работа №14. Определение нитратов в плодах и овоцах.....	58

Лабораторная работа №15. Определение ДДТ в молоке и картофеле.....	62
Лабораторная работа №16. Определение содержания фосфорорганических пестицидов.....	63
Раздел 4. Фальсификация пищевых продуктов.....	64
Лабораторная работа №17. Способы фальсификации алкогольной продукции и методы ее обнаружения.....	71
Раздел 5. Механизм детоксикации ксенобиотиков.....	74
Лабораторная работа №18. Исследование сорбционной способности пектиновых веществ.....	79
Раздел 6. Биотестирование в оценке безопасности.....	85
Лабораторная работа №19. Биотестирование с использованием ракообразных (<i>daphnia magna straus</i>).....	86
Порядок прохождения лабораторного практикума.....	89
Основные правила безопасности при работе в лаборатории.....	90
Библиографический список.....	92

Учебное издание

Никифорова Татьяна Евгеньевна

Биологическая безопасность пищевых продуктов

Лабораторный практикум

Редактор О.А Соловьева

Подписано в печать 8.12.2015. Формат 60×84 ¹/₁₆. Бумага писчая.

Усл. печ. л. 5.58. Тираж 75 экз. Заказ

ФГБОУ ВО «Ивановский государственный
химико-технологический университет»

Отпечатано на полиграфическом оборудовании кафедры экономики и
финансов ФГБОУ ВО «ИГХТУ»

153000, г.Иваново, Шереметевский пр., 7